

USO DE COX-1 PARA LA IDENTIFICACIÓN DE TREMATODOS ADULTOS Y DE HUEVOS EN MUESTRAS DE MATERIA FECAL DE RUMIANTES

Joan Sebastián Davila Vera

Asesor interno

Ligia Consuelo Sánchez Leal

M.Sc

Asesor externo

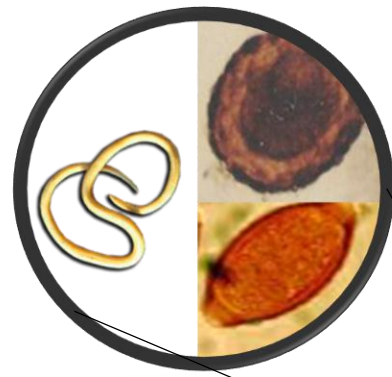
Jimmy Jolman Vargas Duarte

Ph.D



INTRODUCCIÓN

Parasitosis



INTRODUCCIÓN

2,7 a 17
Millones



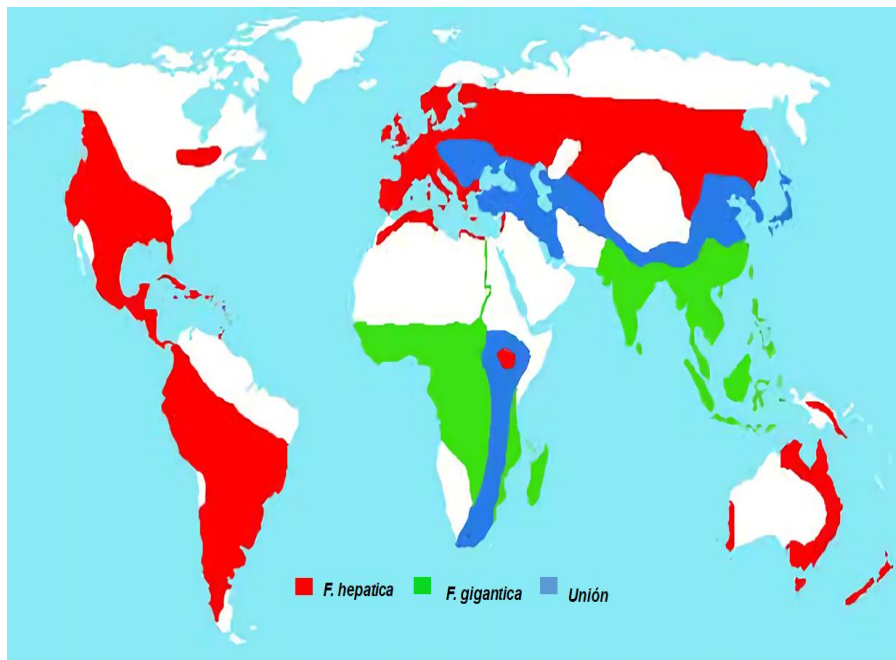
250 Millones



300 Millones



DISTRIBUCIÓN MUNDIAL



Diez, P .2011.

Paz, 2006

López, 2013

Bonilla, 2016



Modificado de https://es.123rf.com/photo_27471410_mapa-mundial.html

DISTRIBUCIÓN NACIONAL

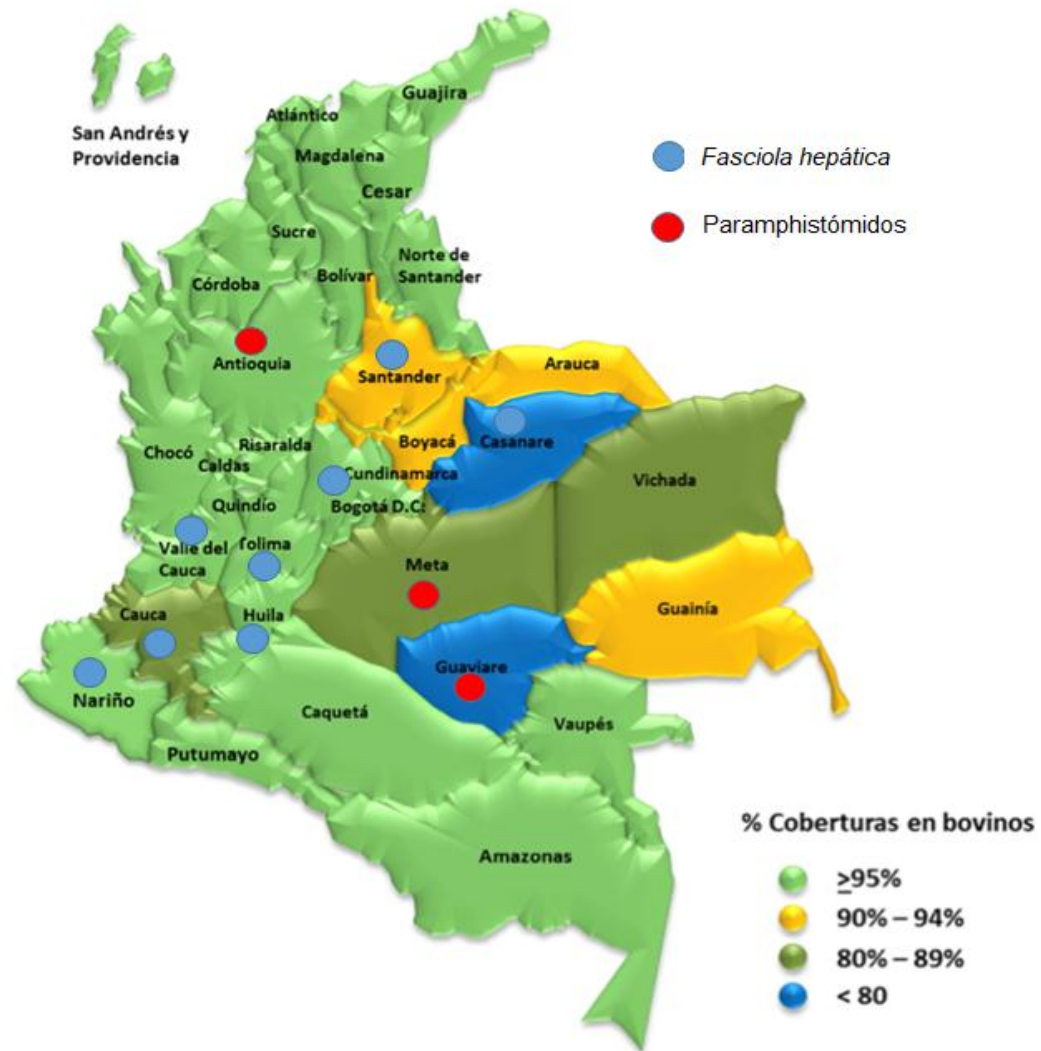
López y col , 2008

Alarcón, 2009

Bedoya, 2012

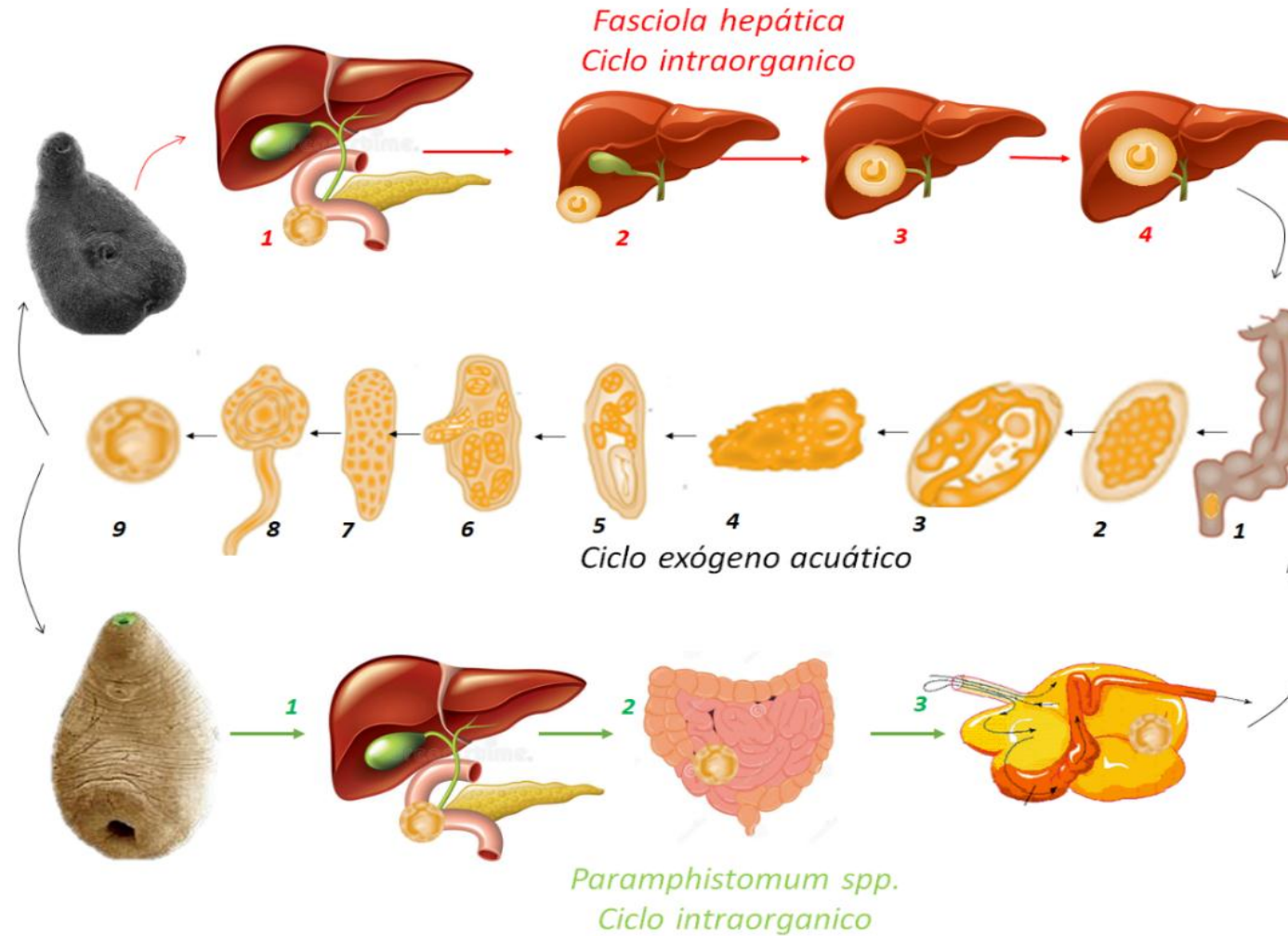
González y col, 2013

Bonilla, 2016



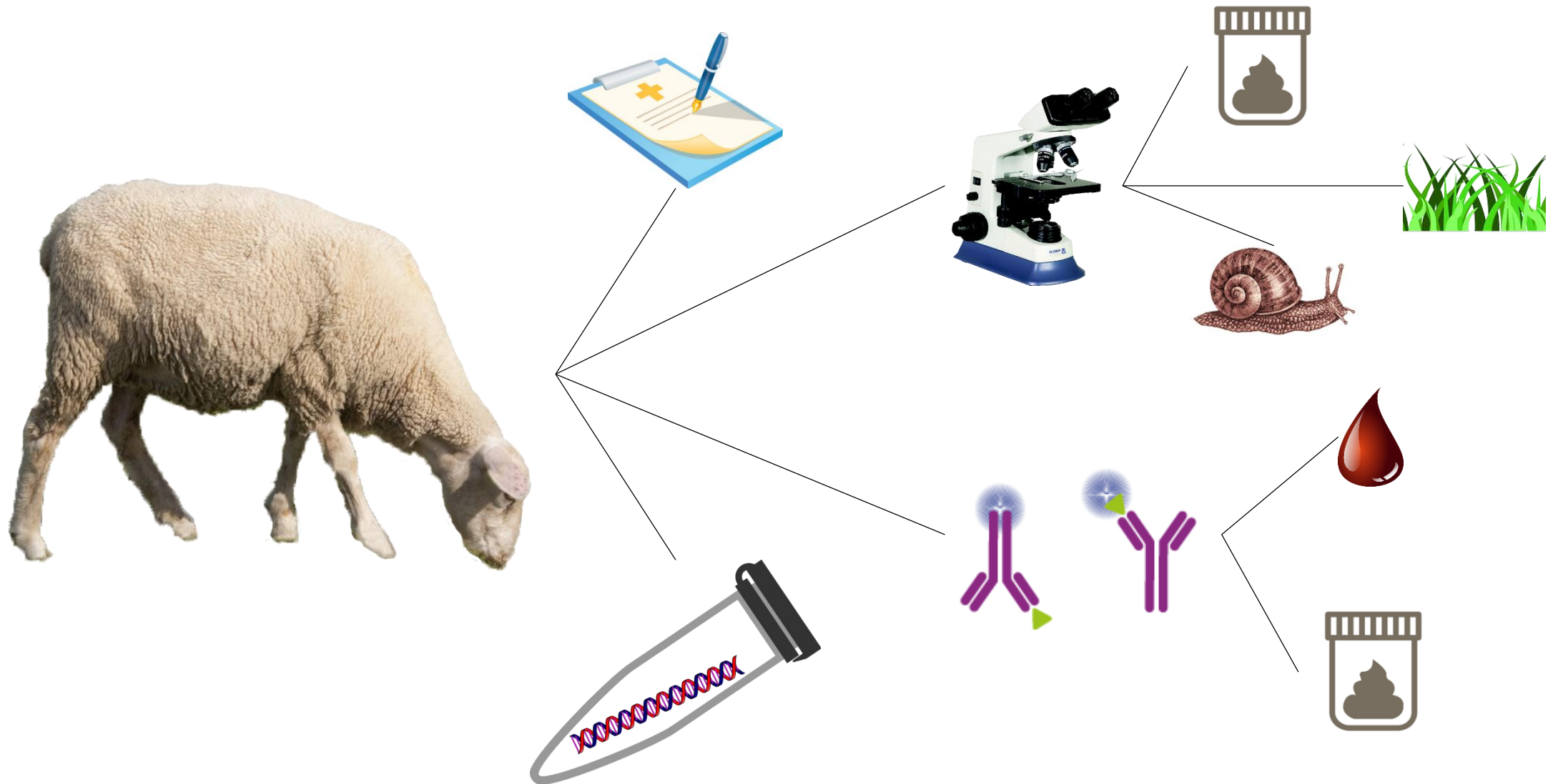
Modificado de: <http://www.fedegan.org.co/programas/programa-de-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-brucelosis-bovina>.

CICLO BIOLÓGICO



Fuente: Elaboración propia, Modificado de Bonilla, R. 2016.

TÉCNICAS USADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE TREMATODOS



OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar parásitos adultos y huevos de la clase de trematoda en muestras de materia fecal de rumiantes usando un set de primers dirigidos al marcador mitocondrial COX-1

Objetivos Específicos

Identificar morfológicamente parásitos adultos de la clase trematoda obtenidos por necropsia en campo.

Estandarizar el uso del marcador mitocondrial COX-1 para la identificación de trematodos adultos de los géneros *Fasciola* spp. y Paramphistómidos.

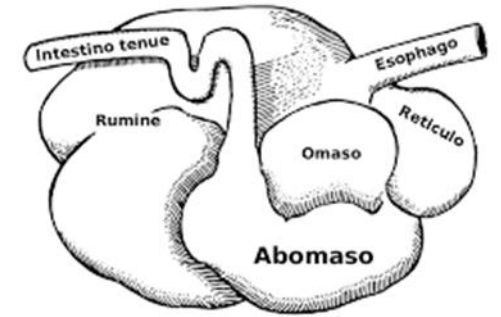
Aplicar el uso del marcador mitocondrial COXI para la identificación de huevos presentes en materia fecal de rumiantes.

METODOLOGÍA

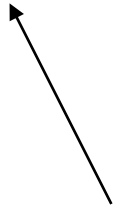
Objetivo 1



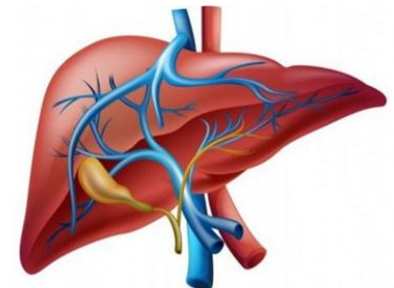
<https://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/4264/3178>



<https://www.pinterest.es/pin/434456695296015652/>



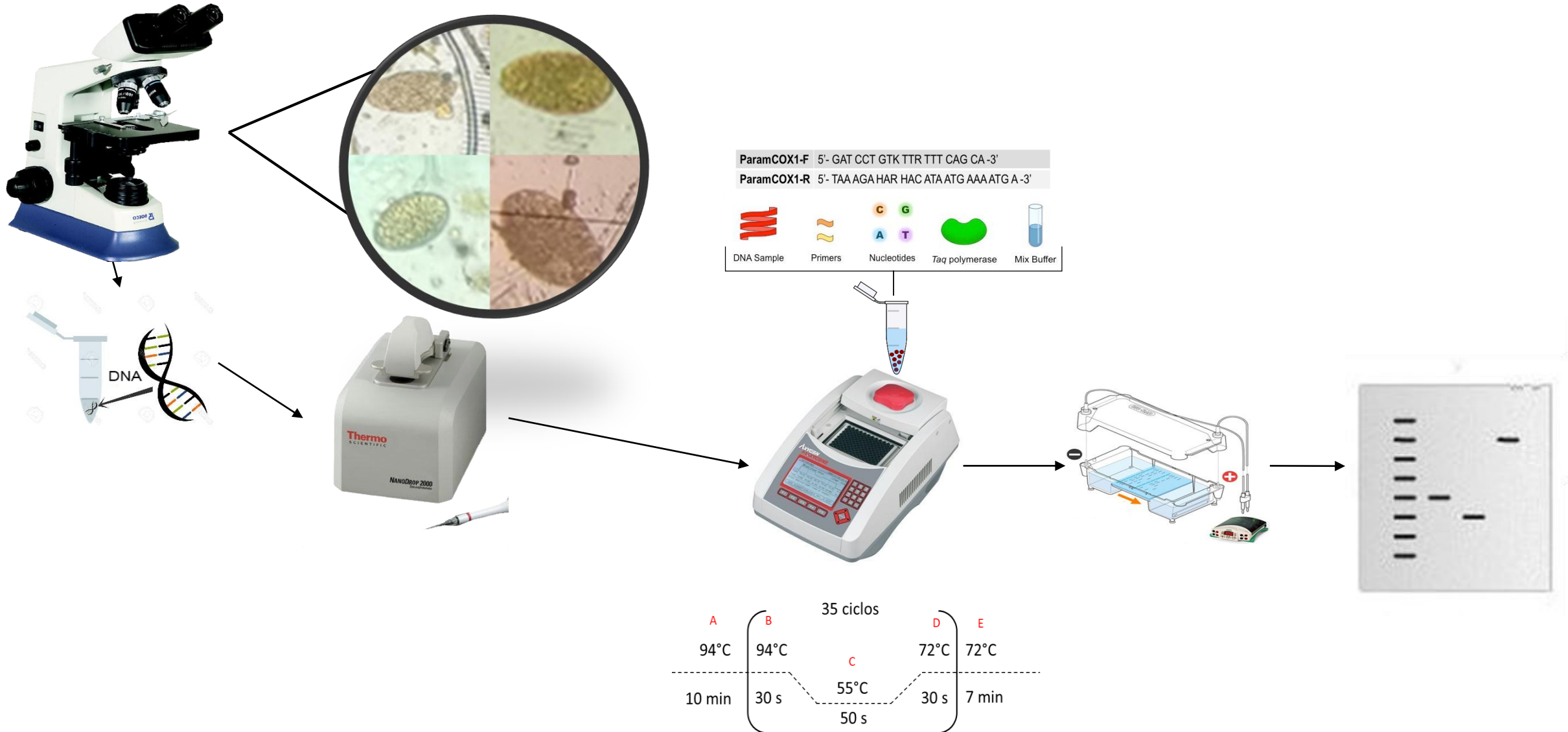
<https://revistas.lasalle.edu.co/index.php/mv/article/view/4264/3178>



<http://www.americatv.com.pe/noticias/salud/higado-graso-sintomas-y-recomendaciones-n261601>

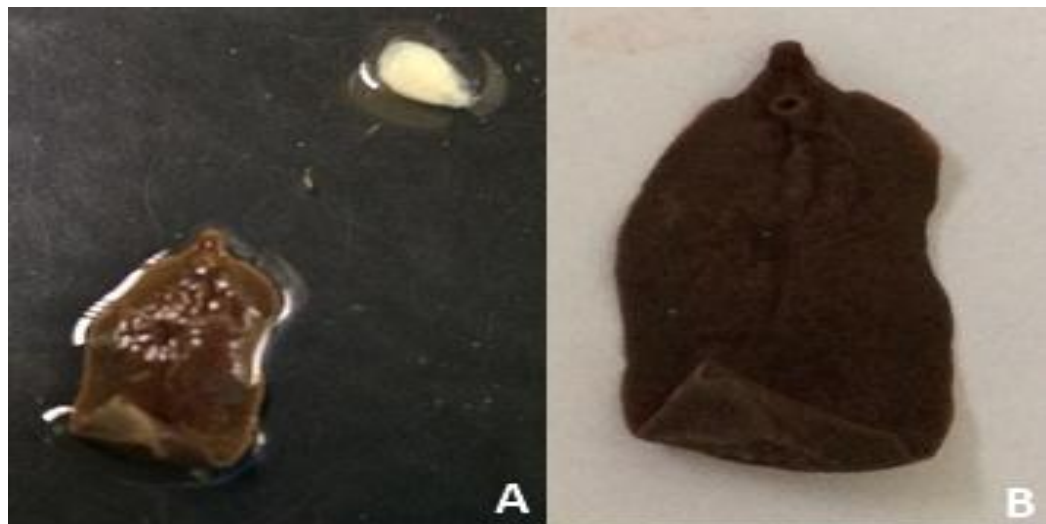
METODOLOGÍA

Objetivo 3



RESULTADOS

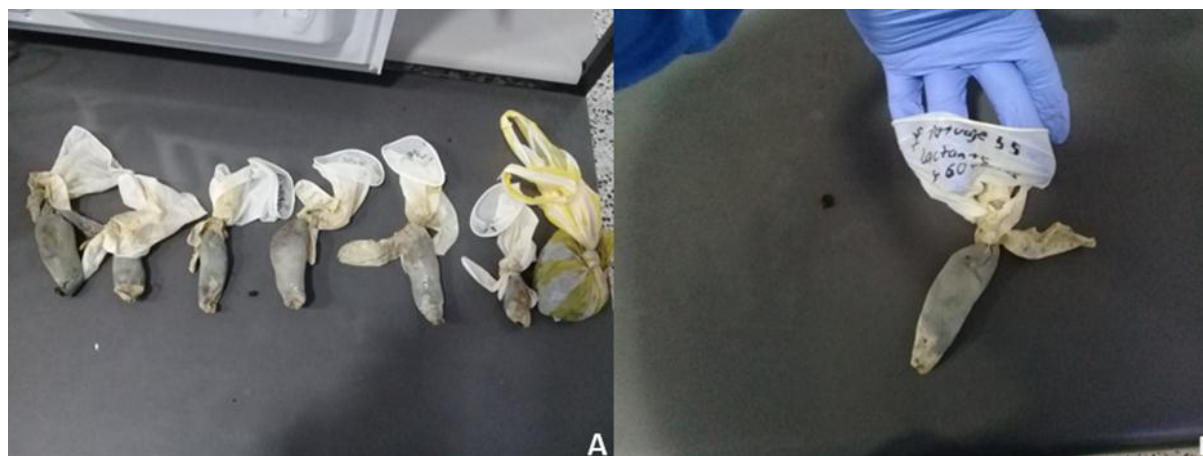
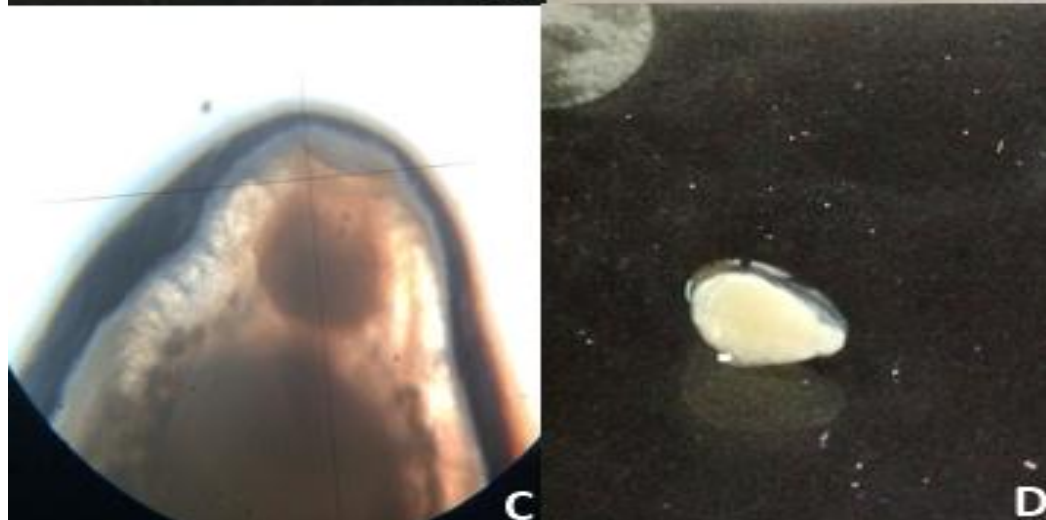
Objetivo 1



Rodríguez, 2014

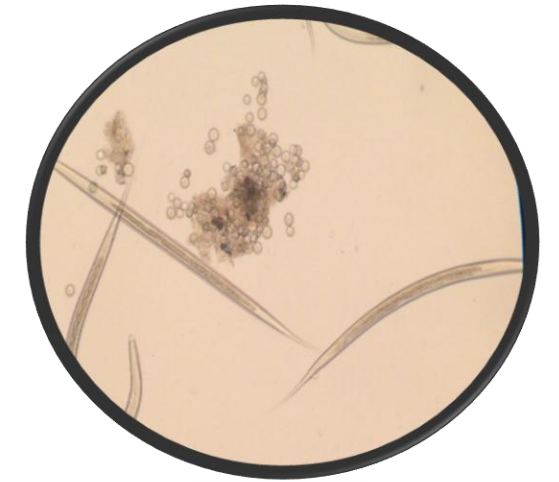
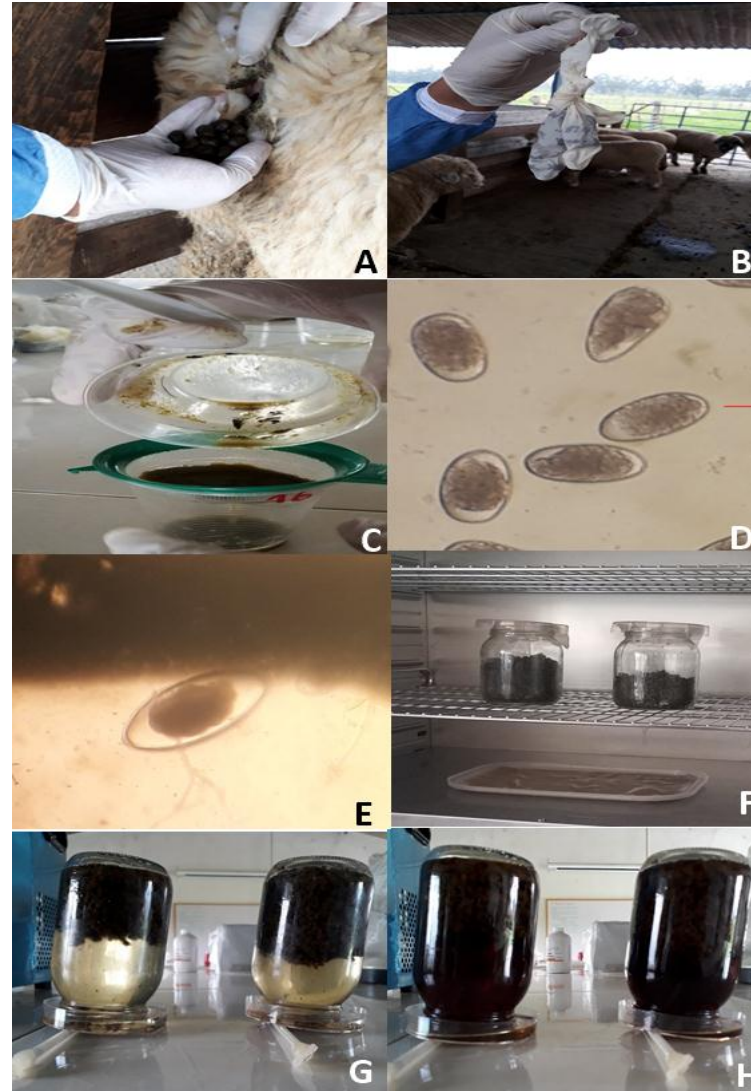
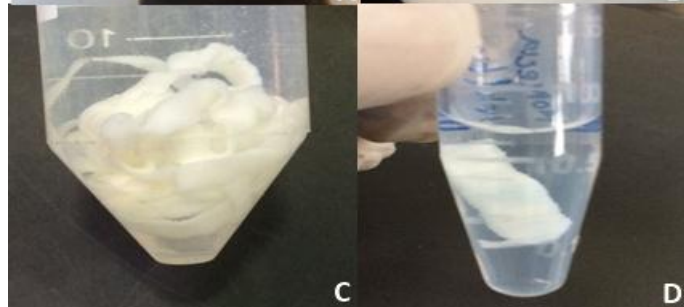
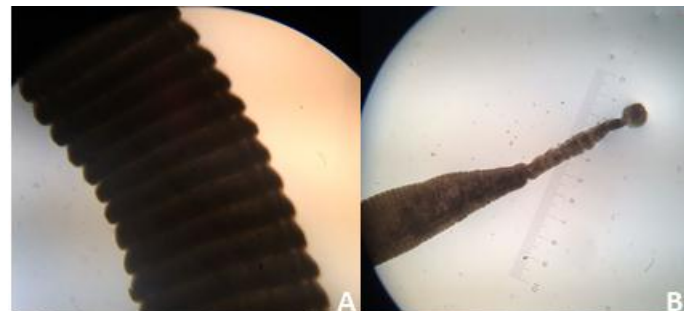
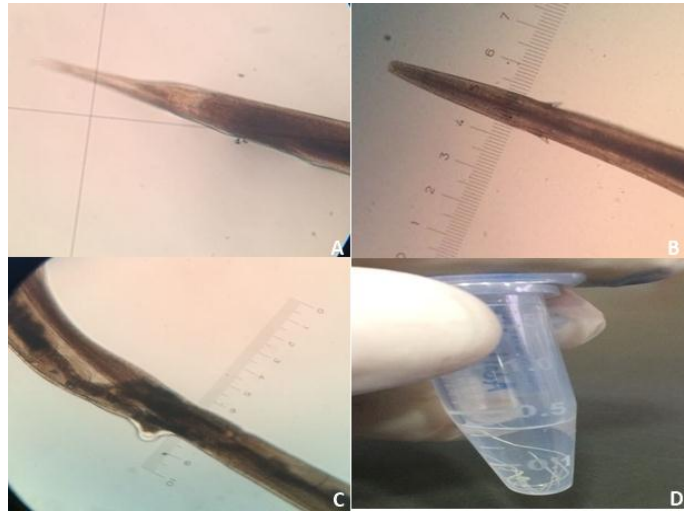
López y col, 2012

Alarcón y col, 2009,



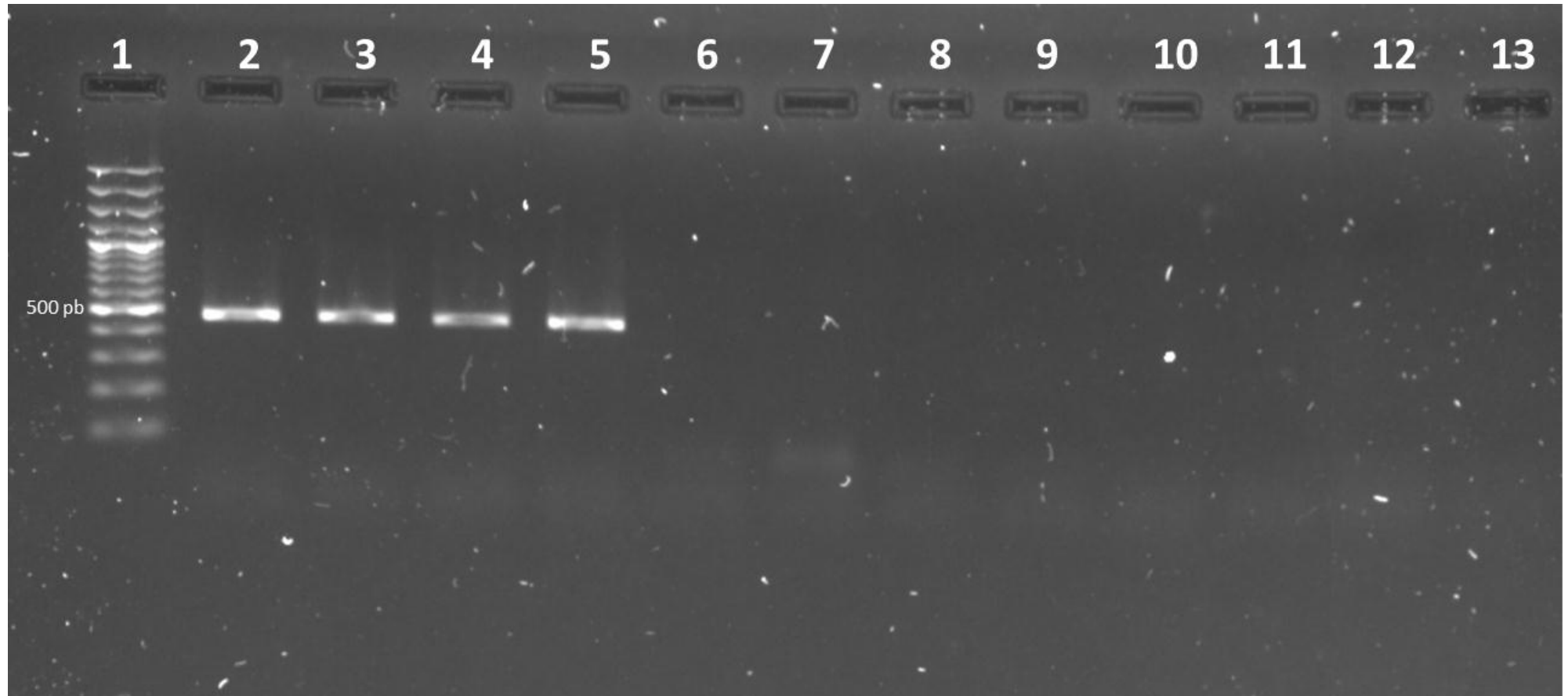
RESULTADOS

Objetivo 2



RESULTADOS

Objetivo 2



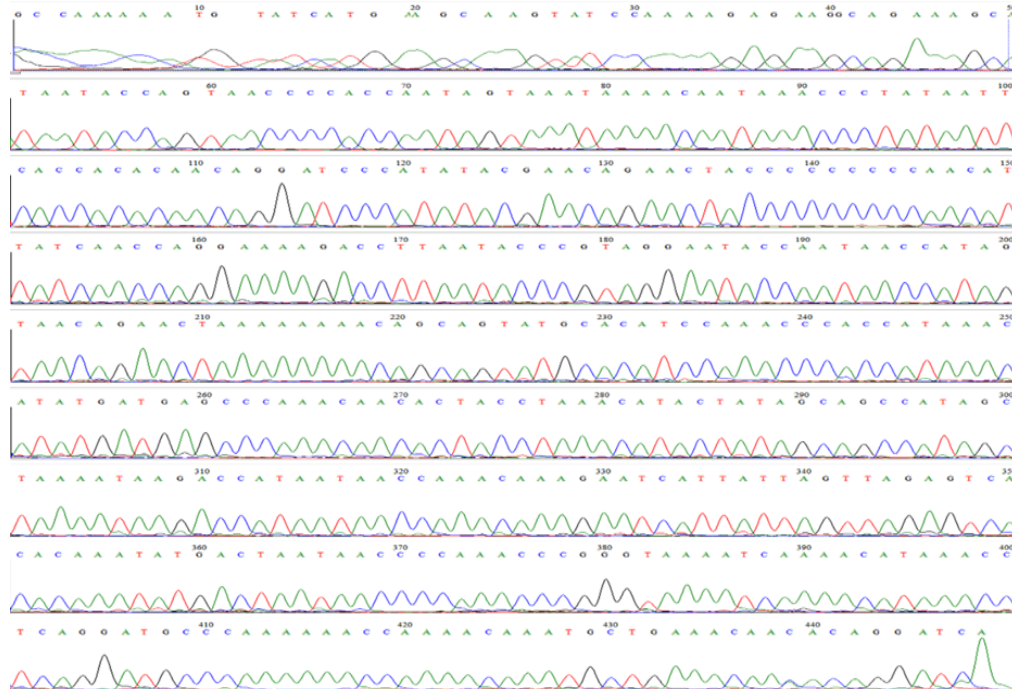
Electroforesis en gel de agarosa

RESULTADOS

POZO 2

Objetivo 2

GCCAAAAATGTATCATGAAGCAAGTATCCAAAAGAGAAGGCAGAAAGCATAATACCAGTAACCCACCAATAGTAAATAAAACAATAAACCCCTATAATTCACCACACAACA
GGATCCCATATACGAACAGAACTACCCCCCCCAACATTATCAACCAGGAAAAGACCTTAATACCCGTAGGAATACCAATAACCATAGTAACAGAACTAAAAAAACAGCAG
TATGCACATCCAAACCCACCATAAACATATGATGAGCCCAAACAACACTACCTAACATACTATAGCAGCCATAGCTAAAATAAGACCATAATAACCAAACAAAGAATCATTAT
TAGTTAGAGTCACACAAATATGACTAATAACCCCAAACCCGGGTAAAATCAAAACATAAACCTCAGGATGCCCAAAAAACCAAACAAATGCTGAAACAACACAGGATCA



Download GenBank Graphics

F.hepatica mtDNA
Sequence ID: [gi|129951X15613.1](#) Length: 3466 Number of Matches: 1
[See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 2545 to 2989 GenBank Graphics Next Match Previous Match

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	771 bits(854)	0.0	440/446(99%)	2/446(0%)	Plus/Minus	
Query	3		CAAAAAATGTATCATGAAGCAA-GTATCCAAAAGAGAAGGCAGAAAGCATAATACCAGTA			61
Sbjct	2989		CAAAACCATGTATCATGAAGCAAAGTATCCAAAAGAGAAG-CAGAAAGCATAATACCAGTA			2931
Query	62		ACCCACCAATAGTAAATAAAACAATAAACCCCTATAATTCACCACACAACAGGATCCCAT			121
Sbjct	2930		ACCCACCAATAGTAAATAAAACAATAAACCCCTATAATTCACCACACAACAGGATCCCAT			2871
Query	122		ATACGAACAGAACTAccccccccAACATTATCAACCAGGAAAAAGACCTTAATACCCGTA			181
Sbjct	2870		ATACGAACAGAACTACCCCCCCCAACATTATCAACCAGGAAAAAGACCTTAATACCCGTA			2811
Query	182		GGAATACCAATAACCATAGTAACAGAACTaaaaaaaaCAGCAGTATGCACATCCAAACCC			241
Sbjct	2810		GGAATACCAATAACCATAGTAACAGAACTAAAAAAAAACAGCAGTATGCACATCCAAACCC			2751
Query	242		ACCATAAACATATGATGAGCCCAAACAACACTACCTAACATACTATAGCAGCCATAGCT			301
Sbjct	2750		ACCATAAACATATGATGAGCCCAAACAACACTACCTAACATACTATAGCAGCCATAGCT			2691
Query	302		AAAAAAGACCATAATAACCAAACAAGAAATCATTATTAGTTAGAGTCACACAAATATGA			361
Sbjct	2690		AAAAAAGACCATAATAACCAAACAAGAAATCATTATTAGTTAGAGTCACACAAATATGA			2631
Query	362		CTAATaaccacccccggggtaaaaatcaaaacataaacctcaggatgcccaaaaaaaccaa			421
Sbjct	2630		CTAATAACCCCAAAACCCGGGTAAAATCAAAACATAAACCTCAGGATGCCCAAAAAACCAA			2571
Query	422		aacaaatgctgaaacaacaCAGGATC	447		
Sbjct	2570		AACAATGCTGAATAAAACAGGATC	2545		

Itagaki, 2005 498pb

Moazeni y col, 2012. 493 pb

Martin, 2014. 399 pb

RESULTADOS

POZO 4

Objetivo 2

ACAAATCCAGGGTAATCATTGCAACCATAAGAATCTAATACACAAGAAGATAAACTATACCGGTTACACCACCCATAGTAAACAACACAATAAAACCCATAATTCATCACA
CAACAGGATCCCAAACACGAATACCAGCACCCTCGACATATATAATCAAGAAAACACCTTTATACCCGTCGGGATACCTATAACCATAGTCACAGAATAAAAAATACAGAT
GTCTTCACATCTTAACCCACCATAAACATATGATGTGCCAAACAACACCACCCAAACAACTATAGAAGCCATAGCAAACACTAAACCATAATAACCAAACAACGAATCTTG
ATTCCTTATTCTCATACAAATATGACTTACAGCCCCAAAACCAGGTAAAATCAACACATATACCTCGGGATGTCCGAAAATCAAATAAATGCTGAAACAAAACAGGATCA

Download GenBank Graphics

Paramphistomum cervi mitochondrion, complete genome
Sequence ID: [gii924859573|KT198987.1](#) Length: 14023 Number of Matches: 1

Range 1: 7590 to 8015 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
524 bits(580)	2e-146	373/427(87%)	1/427(0%)	Plus/Minus

Query 25 ACCATAAGAAATCTAATACACAAGAAGATAAACTATACCGGTTACACCACCCATAGTAAA 84
Sbjct 8015 ACCATA-GAATCTAATACACAAGAAGACAATACTATCCCGATTACACCACCAATAGTAAA 7957

Query 85 CAACACAATAAAACCCATAATTCATCACACAACAGGATCCCAAACACGAATACCAGCACC 144
Sbjct 7956 TAAACTATAAAACCCATAATTCACCATAACAACAGGATCCCAAATACGAACCTCGTACC 7897

Query 145 ACTCGACATATATAATCAAGAAAACACCTTTATACCCGTCGGGATACCTATAACCATAGT 204
Sbjct 7896 ACTCAACATATACAACCAAGAAAACACCTTAATACCTGTAGGTATACCTATTACCATCGT 7837

Query 205 CACAGAACTAAAAAATACAGATGTCTTCACATCTTAACCCACCATAAACATATGATGTGC 264
Sbjct 7836 TACAGACCTAAAAAATACGGACGCTTAAACATCCAACCTACCATAAACATATGATGAGC 7777

Query 265 CCAAACAACACCACCCAAACAACTATAGAAGCCATAGCAAACACTAAACCATAATAACC 324
Sbjct 7776 CCAAACAACACTACCCAAACAACAATAGATGCCATAGCAAACACCAAACCATAATAACC 7717

Query 325 AAACAACGAATCTTGATTCTTATTCTCATACAAATATGACTTACAGCCCCAAAACCAGG 384
Sbjct 7716 AAACAACGAATCTTGATTCTTAACTCATACAAATATGACTTAAACCCCGAAACCCGG 7657

Query 385 TAAAAACAACACATATACCTCGGGATGTCCGAAAATCAAATAAATGCTGAAACAAAAC 444
Sbjct 7656 CAAAATCAACACATAAACCTCAGGGTGCCAAAAAACCAAATAAATGCTGAAACAAAAC 7597

Query 445 AGGATCA 451
Sbjct 7596 AGGATCA 7590

Download GenBank Graphics

Calicophoron microbothrioides mitochondrion, complete genome
Sequence ID: [gii827502471|KR337555.1](#) Length: 14028 Number of Matches: 1

Range 1: 7637 to 8062 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
536 bits(594)	4e-150	376/427(88%)	1/427(0%)	Plus/Minus

Query 25 ACCATAAGAAATCTAATACACAAGAAGATAAACTATACCGGTTACACCACCCATAGTAAA 84
Sbjct 8062 ACCATA-GAATCTAACAACACAGGACGATAAACTATACCGGTAACACCCCTATAGTAAA 8004

Query 85 CAACACAATAAAACCCATAATTCATCACACAACAGGATCCCAAACACGAATACCAGCACC 144
Sbjct 8003 CAATACAATAAAACCCATAATTCACCACACAACAGGATCTCAAACACGAACACCCGTACC 7944

Query 145 ACTCGACATATATAATCAAGAAAACACCTTTATACCCGTCGGGATACCTATAACCATAGT 204
Sbjct 7943 ACTTAACATATACAACCAAGAAAATACCTTAATTCCTGTTGGTATACCTATTACCATCGA 7884

Query 205 CACAGAACTAAAAAATACAGATGTCTTCACATCTTAACCCACCATAAACATATGATGTGC 264
Sbjct 7883 CACAGACCTAAAAAACACAGATGTCTTCACATCTAAACCAACCATAAACATATGATGAGC 7824

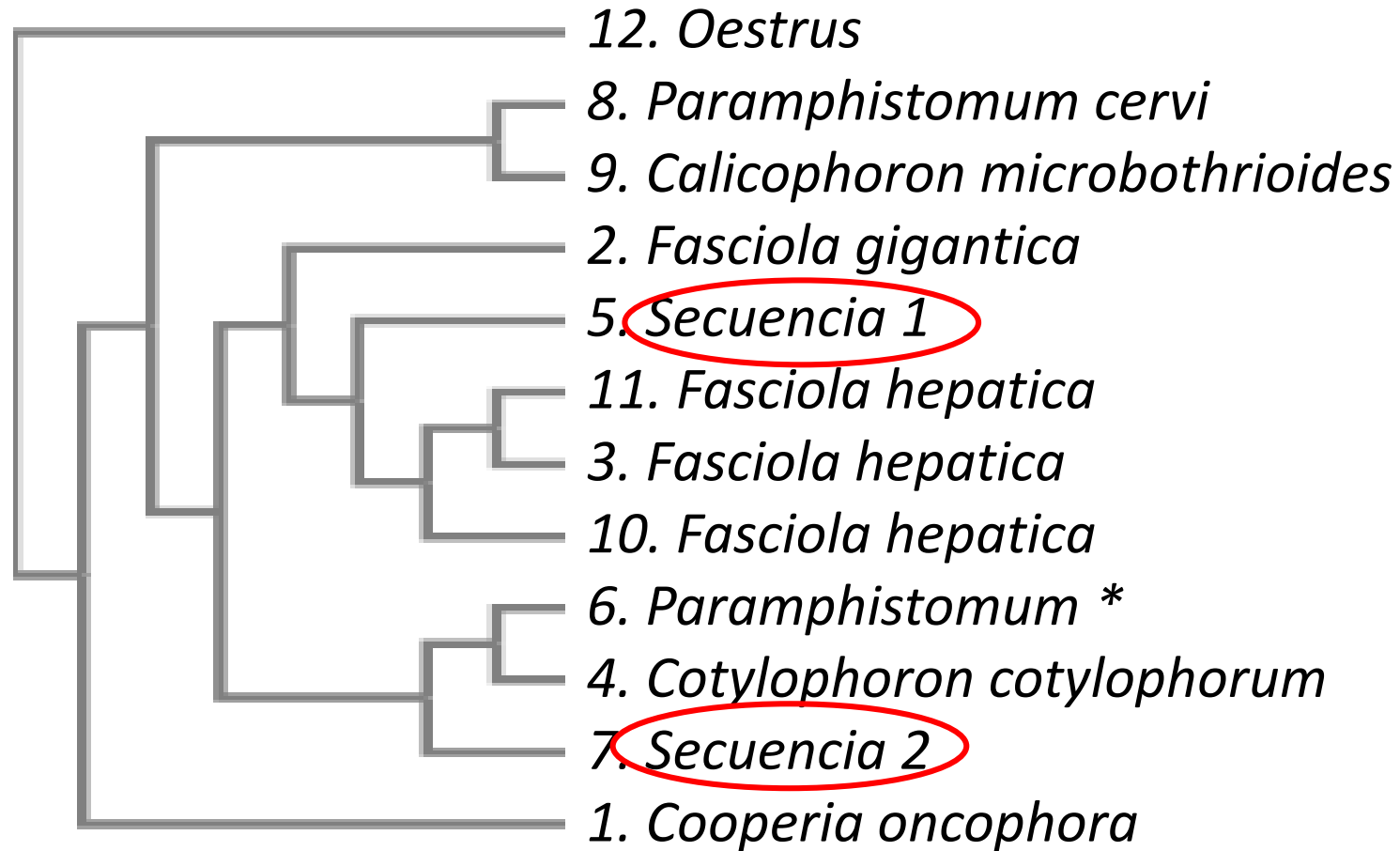
Query 265 CCAAACAACACCACCCAAACAACTATAGAAGCCATAGCAAACACTAAACCATAATAACC 324
Sbjct 7823 CCACACCACACTACCCAAACAGACAATAGAAGCCATAGCAAATACTAAACCATAATAACC 7764

Query 325 AAACAACGAATCTTGATTCTTATTCTCATACAAATATGACTTACAGCCCCAAAACCAGG 384
Sbjct 7763 AAATAACGAATCTTGATTCTTAACTCATACAAATATGCCTCACAGCACCCGAAACCCAGG 7704

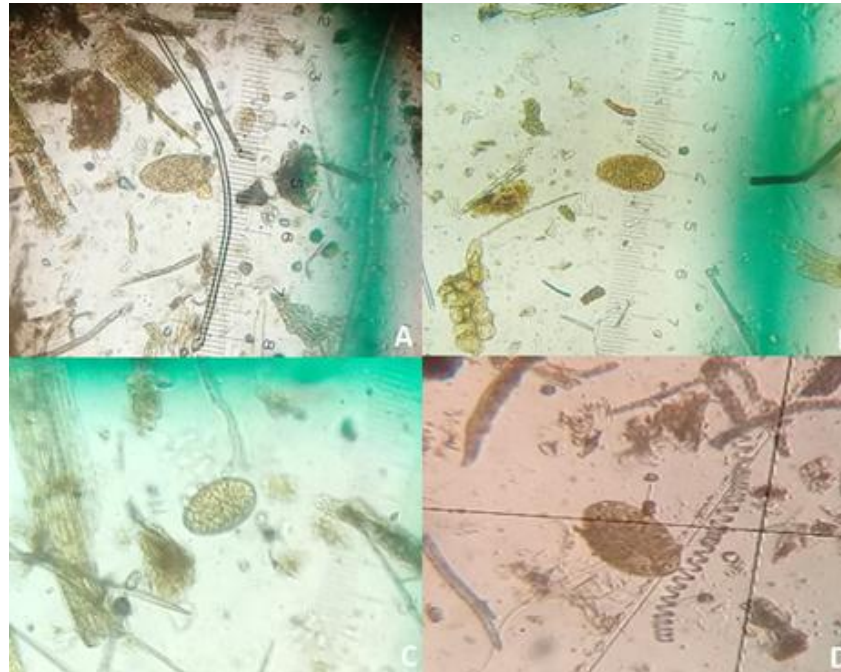
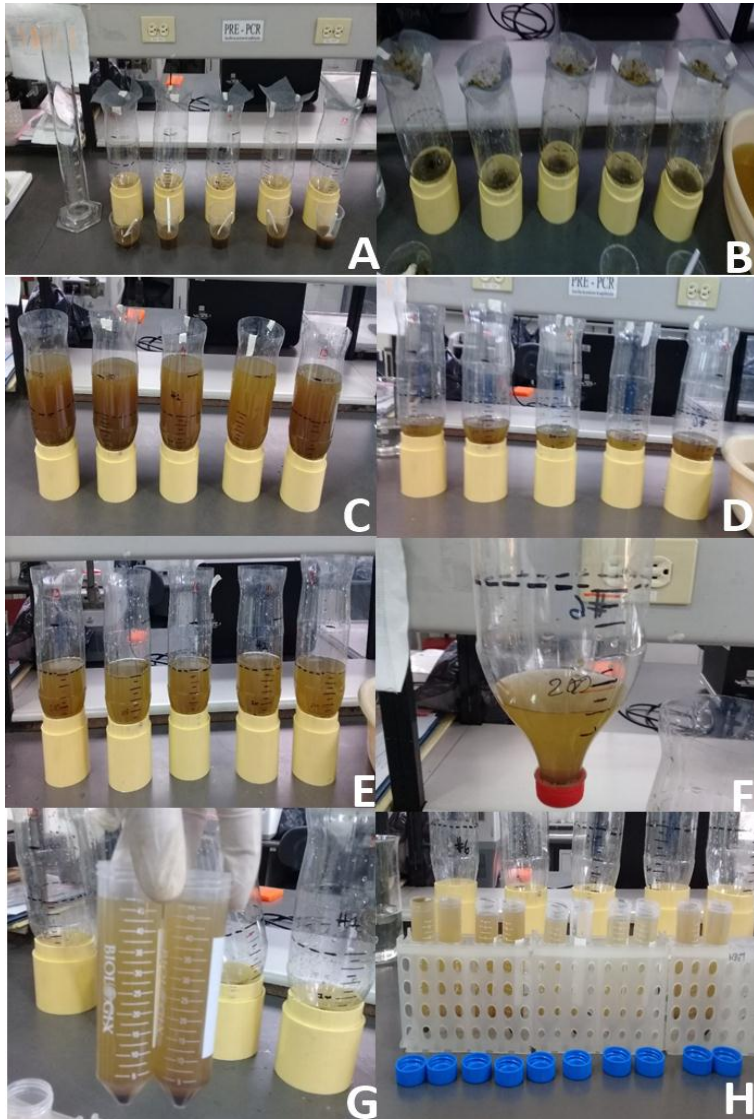
Query 385 TAAAAACAACACATATACCTCGGGATGTCCGAAAATCAAATAAATGCTGAAACAAAAC 444
Sbjct 7703 CAAAATCAACACATAAACCTCAGGATGACCAAAAAACCAAACAATGCTGAAACAAGAC 7644

Query 445 AGGATCA 451
Sbjct 7643 AGGATCA 7637

ÁRBOL FILOGENÉTICO



RESULTADOS



Objetivo 3

López en 2008, trópico alto
occidente colombiano

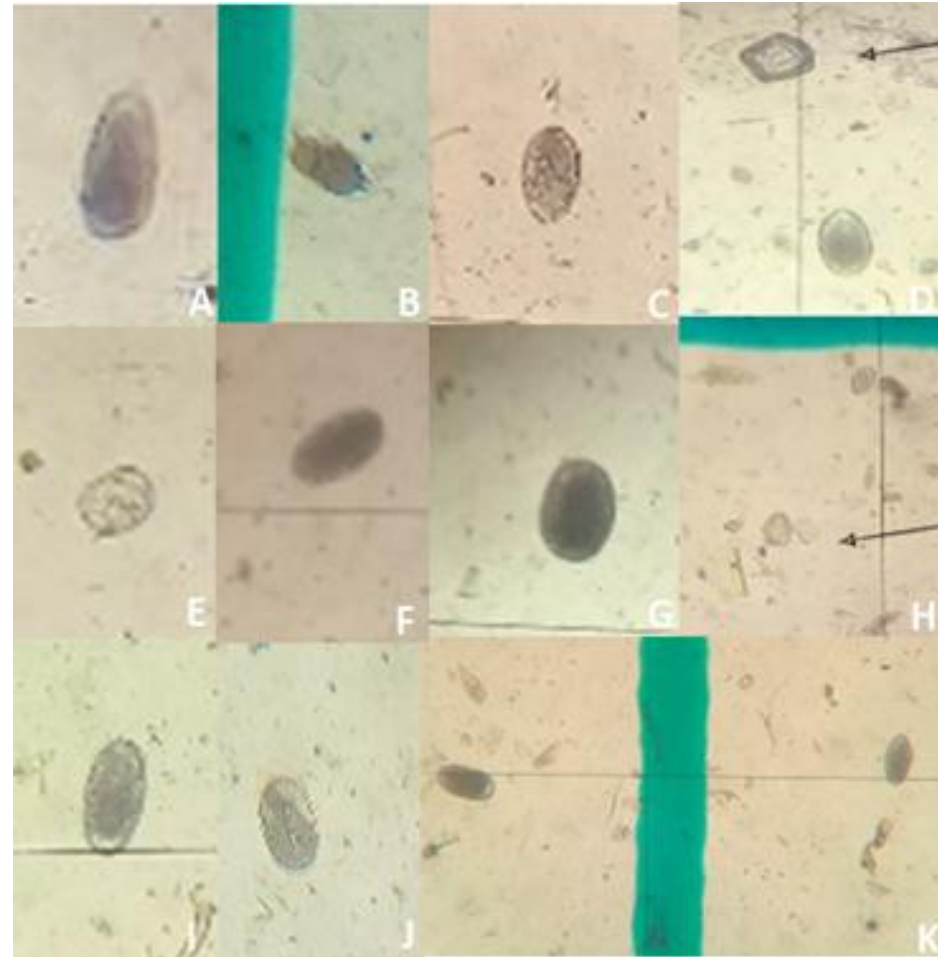
Paucar en 2010, Oxapampa
Perú

Sánchez en 2013, Chivata

Wilches y col en 2009 san
Nicolás Antioquia

RESULTADOS

Objetivo 3



RESULTADOS

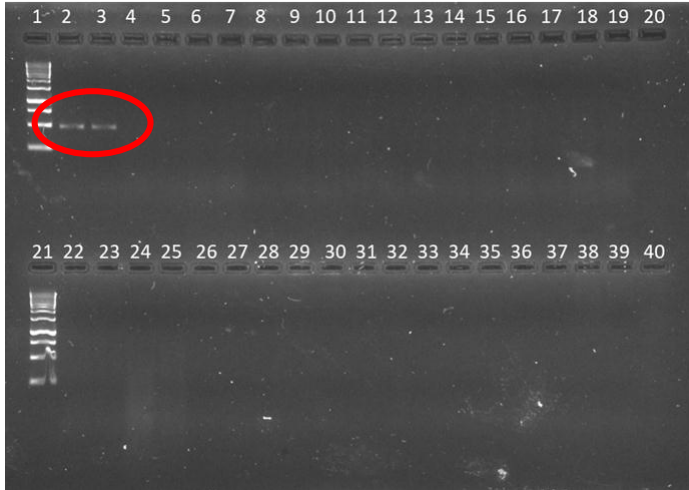
Objetivo 3

#	DATOS	HT	HN	HC
1	Tatuaje 22, preñada de 36 meses	negativo	positivo	negativo
2	Tatuaje 07, preñada de 60 meses	positivo	positivo	negativo
3	Tatuaje 55, lactante de 60 meses	negativo	positivo	negativo
4	Tatuaje 22, lactante de 60 meses	positivo	positivo	negativo
5	Tatuaje 25, hembra de 9 meses	positivo	positivo	negativo
6	Tatuaje 27, lactante de 48 meses	negativo	positivo	negativo
7	Tatuaje 0835, vacía de 8 meses	positivo	positivo	positivo
8	Tatuaje 03, lactante de 48 meses	negativo	negativo	negativo
9	Tatuaje 16, preñada de 25 meses	negativo	positivo	negativo
10	Tatuaje 05, preñada de 50 meses	negativo	positivo	negativo

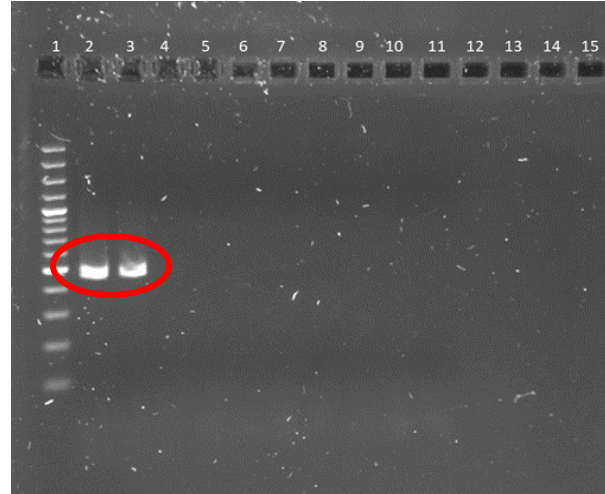
PRESENCIA DE HUEVOS DE ACUERDO A LA TÉCNICA USADA

RESULTADOS

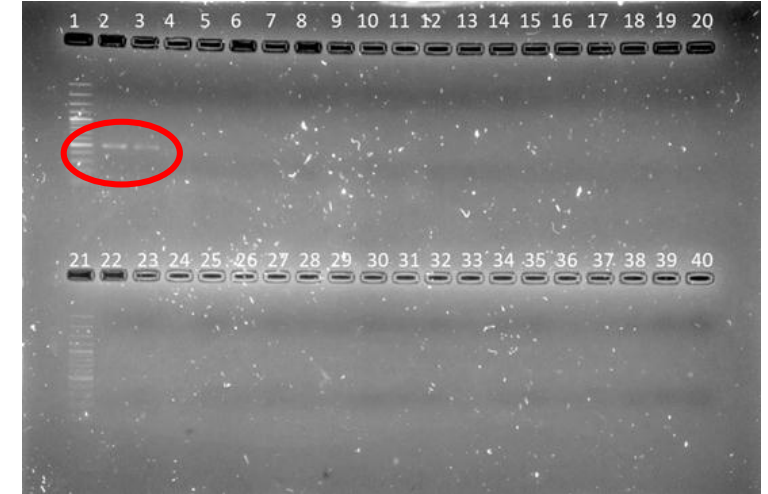
Objetivo 3



Fenol y QIAamp DNA Mini Kit



Mx al azar 1:10, 1:20 y 1:50

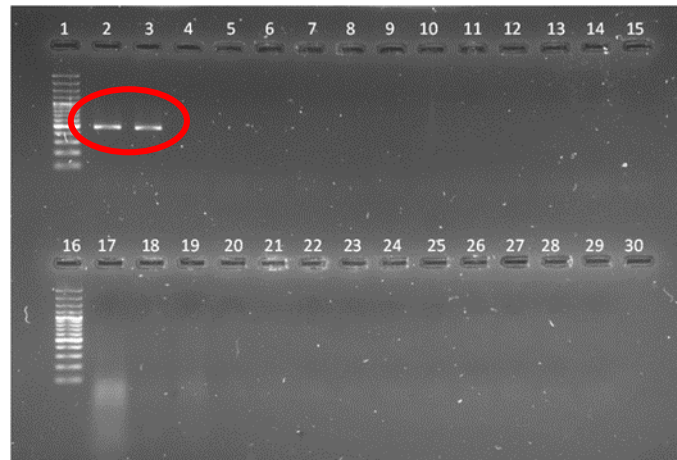


Muestra 1 y 2 extraída con fenol, dil 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200, y muestra 1 y 2 extraída con kit, di 1:20, 1:50, 1:100 y 1:200

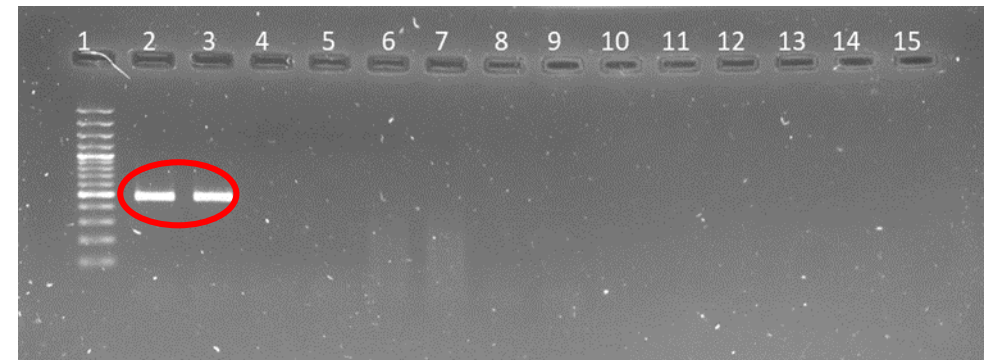
Restrepo 2010, Bogota.

Paz 2014, Santiago de Chile

Tamay de Dios 2013 México.



Mc Master. Muestra 1 al 8 pura y dil 1:20



kits comerciales ZR Plant/Seed DNA Kit™ y ZymoBIOMICS™ DNA Mini Kit

CONCLUSIONES

La utilización de primers degenerados permiten la correcta amplificación de más de una especie de parásito perteneciente a la misma clase, en este caso Trematoda; sin embargo, la calidad o tipo de la muestra juega un papel importante cuando se desea hacer un diagnóstico diferencial, pues, aunque la técnica de sedimentación rápida modificada muestra una buena sensibilidad para el diagnóstico no permite la diferenciación de las especies debido a la similitud de las características morfológicas del huevo; y, la necropsia en campo, aunque permite la diferenciación de las especies en su estadio adulto solo puede ser usada si se sacrifica el animal.

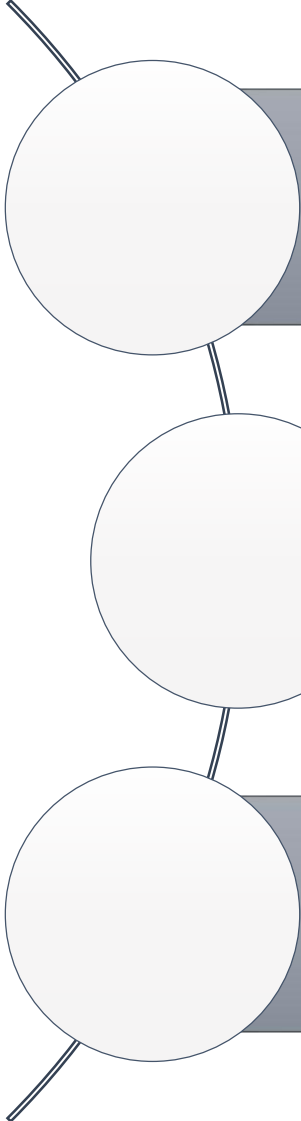
El genoma mitocondrial se presenta como una técnica útil y eficiente para el diagnóstico y diferenciación de las especies debido a que tiene regiones altamente conservadas que la hacen específicas para cada parásito pues se consideran el código de barras de la vida; sin embargo, su utilización hasta ahora está dada para las muestras de ADN procedentes del parásito.

CONCLUSIONES

Los inhibidores presentes tanto en la materia fecal como en los componentes usados en la extracción de ADN dificultan la correcta amplificación por acción inespecífica del ADN polimerasa dada por los iones Mg presentes en la muestra, o por la precipitación o desnaturalización del ADN, que impiden la correcta amplificación de la secuencia diana.

Las comparaciones de las secuencias obtenidas en el GenBank dejan en manifiesto la presencia de *F. hepatica* y Paramfistómidos como parásitos obtenidos por la necropsia en campo y como posibles causantes de infección en rumiantes de Nobsa, Boyacá y Villavicencio, Meta.

RECOMENDACIONES



Se sugiere usar las secuencias obtenidas para la elaboración de primers específicos

Los ensayos con Hospederos intermediarios podrían permitir mejor obtención de muestras con menores inhibidores que los presentes en materia fecal

Utilización de otros tipos de PCR con características más avanzadas, como una PCR anidada que permite una amplificación más específica

AGRADECIMIENTOS

A mi Familia, ya que sin su apoyo y comprensión en todo momento no hubiese sido posible la finalización de este proyecto.

Al doctor Jimmy Jolman Vargas duarte y las profesoras Ligia Consuelo Sánchez Leal y Martha Posada; quienes con su conocimiento me guiaron a lo largo del desarrollo de este trabajo de grado brindando su confianza y apoyo incondicional.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca quien siendo mi alma mater me brindo por medio de sus docentes el conocimiento necesario para la realización de este proyecto.

Al Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia que me acogió en sus laboratorios para poder llevar a cabo mi trabajo de grado.

A todas las personas que de una u otra manera me apoyaron y guiaron para alcanzar las metas que había establecido.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- López L, Romero J, Velazquez L. Aislamiento de Paramphistomidae en vacas de leche y en el hospedador intermediario (*Lymnaea truncatula* y *Lymnaea columella*) en una granja en el trópico alto en el occidente de Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008 Enero; 21.
- Álvarez A, Boyaca M. Comparacion de la tecnica de Dennis con los hallazgos hepaticos post-mortem para el diagnóstico de fasciolosis bovina. *Cultura científica.* 2009; 7.
- Alarcon E, Velasquez L. Descripción morfológica de *Cotylophoron cotylophorum* (digenea: paramphistomidae) hallado en bovinos en Rionegro Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2009 Abril; 22.
- Thanh H, Blair D, McManus D. Mitochondrial genomes of parasitic flatworms. *Trends on parasitology.* 2002 Mayo; 18(5).
- Amor B, Halajian A, Farjallah S, Merella P, Said K, Slimane B. Molecular characterization of *Fasciola* spp. From the endemic area of the northern Iran based on nuclear ribosomal sequences. *Experimental Parasitology.* 2011 abril; 128.
- Bonilla R. "DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE TREMATODOSIS EN GANADO VACUNO DE COLOMBIA: FASCIOLOSIS Y PARAMPHISTOMIDOSIS". Tesis Doctoral. Lugo: UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA, Lugo; 2016.
- López J. Situación actual de la Paramphistomosis en México. Monografía. Coahuila: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna , Torreon ; 2013.
- Itagaki T, Kikawa M, Sakaguchi K, Shimo JTKST, Fukuda K. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology.* 2005 julio; 131.
- Paucar S CACESF. PREVALENCIA DE FASCIOLIASIS Y PARAMFISTOMIASIS EN EL GANADO LECHERO DE OXAPAMPA, PASCO. *Rev Inv Vet Perú.* 2010; 21(1).
- Restrepo Cardona LC. Extandarización y optimización de los protocolos para la extracción de ADN y amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial, a partir de heces de ocelote (*Leopardus pardalis*). Trabajo de grado. Bogota. D.C: Pontificia Universidad Javeriana , Bogota. D.C; 2010.
- Paz C. Comparación de la inhibición de reacción en cadena de la polimerasa según la extracción de DNA de *Cryptosporidium* spp-. Trabajo de grado de pregrado. Santiago de Chile: Universidad de Chile, Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias; 2014.
- Hong-Bin Y, al e. The Mitochondrial Genome of *Paramphistomum cervi* (Digenea), the First Representative for the Family Paramphistomidae. *Plos One Neglectec.* 2013 Agosto; 8(8).
- Rodriguez L. Determinación de la presencia de *Fasciola hepatica* en bovinos sacrificados en la planta de beneficio del municipio de Sutamarchan- Boyaca. trabajo de grado. Tunja: Fundacion universitaria Juan de Castellanos, acultad de ciencias agrarias; 2014.

Un poco más de persistencia, un poco más de esfuerzo, y lo que parecía irremediablemente un fracaso puede convertirse en un éxito glorioso.

-Elbert Hubbard.