

“CONACYT, desarrollando cultura de ciencia, tecnología, innovación y calidad”

## FINANCIAMIENTO DE BECAS DE INVESTIGACIÓN

### “ESTUDIO MOLECULAR Y EPIDEMIOLÓGICO DE ESPECIES DE LA FAMILIA ANAPLASMATACEAE DETECTADAS EN PERSONAL VETERINARIO EN GRAN ASUNCIÓN, PARAGUAY”

Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica- CEDIC

María José Tintel Astigarraga– tintelvet@gmail.com

#### RESUMEN

Las bacterias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* pertenecen a la Familia Anaplasmatacea y son transmitidas por garrapatas. La ehrlichiosis y anaplasmosis son enfermedades zoonóticas emergentes cuyas manifestaciones clínicas son inespecíficas, y se confunden con enfermedades tropicales como Dengue y Chikunguya. El diagnóstico es difícil debido a la inespecificidad de los síntomas y las limitaciones laboratoriales. En Paraguay, solo existe un reporte de Anaplasmosis y Ehrlichiosis humana, en personal veterinario en contacto frecuente con animales domésticos. La ausencia de mayores reportes nacionales podría deberse a la falta de métodos diagnósticos específicos y la diversidad de sintomatología clínica. Por este motivo, nos hemos planteado en este trabajo la implementación y desarrollo de técnicas moleculares que permitan identificar de manera rápida y específica agentes de la Familia Anaplasmatacea y evaluar su impacto epidemiológico a nivel país.

#### OBJETIVOS

- 1- Desarrollo de PCR a tiempo real para detectar la presencia o ausencia de ADN de la Familia Anaplasmataceae en muestras de sangre humana con riesgo laboral.
- 2- Establecer el porcentaje de la sensibilidad de la detección por PCR en comparación con el método clásico de diagnóstico citológico.
- 3- Caracterizar por secuenciación los diferentes agentes infecciosos de la Familia Anaplasmataceae utilizando como marcador el gen del ARNr 16S.
- 4- Estandarizar una técnica de RT- PCR en tiempo real para la amplificación de ARNm de la Familia Anaplasmataceae.
- 5- Determinar molecularmente la viabilidad de los agentes infecciosos detectados en muestra de sangre mediante la amplificación de ARNm.
- 6- Evaluar la asociación de los patógenos molecularmente detectados con características clínico epidemiológicas.

#### APORTES DE LA INVESTIGACIÓN

Capacitación y desarrollo en técnicas moleculares para agentes de la Familia ANAPLASMATACEAE, además de crear y fortalecer vínculos internacionales e interinstitucionales

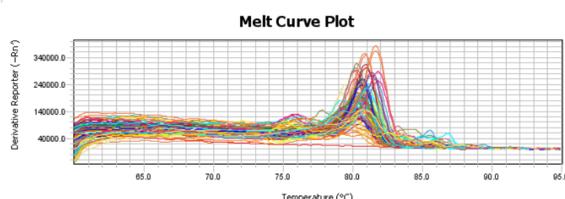


Imagen 1. Primera qPCR realizada en termociclador QuantStudio 3

#### ACTIVIDADES REALIZADAS

- Diseño de primers a partir secuencias genómicas completas obtenidas del Gen Bank.
- Síntesis de primers seleccionados con 375 pb.
- Evaluación y verificación de la concentración de los primers seleccionados para qPCR HRM por medio de espectrofotometría.
- Entrenamiento en realización de PCR Convencional con variación de tiempo de annealing.
- Elaboración de gel de agarosa de todos los experimentos realizados para electroforesis y verificación del tamaño y pureza de los productos de PCR.
- Entrenamiento de purificación de ADN a partir de gel de agarosa.
- Purificación del producto de la electroforesis a partir de gel de agarosa para posterior secuenciamiento.
- Secuenciamiento genético de los productos purificados.
- Entrenamiento para extracción ARN con diferentes métodos.
- Síntesis de cDNA y realización de PCR a partir del cDNA.
- Visualización del producto por electroforesis mediante gel de agarosa

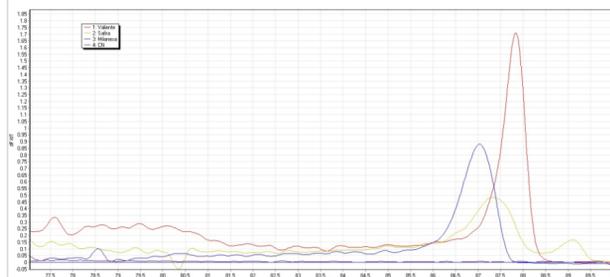


Imagen 2. Gráfico de amplificación Qpcr en termociclador Rotor Gene.

#### RESULTADOS OBTENIDOS

- Realización de capacitación en el desarrollo de la técnica molecular tanto PCR tiempo final como PCR tiempo real para la estandarización de la técnica, cuyos productos obtenidos de ambas técnicas fueron visualizados en geles de agarosa para determinar tamaño del peso molecular esperado.
- Determinación de presencia de agentes de la Familia Anaplasmataceae en muestras de sangre mediante la técnica PCR HRM, cuyos productos obtenidos fueron purificados para secuenciamiento y confirmación de especie amplificada.
- Determinación de viabilidad de agentes determinados mediante RT- PCR, mediante la práctica de la realización de curva padrón para establecer carga bacteriana

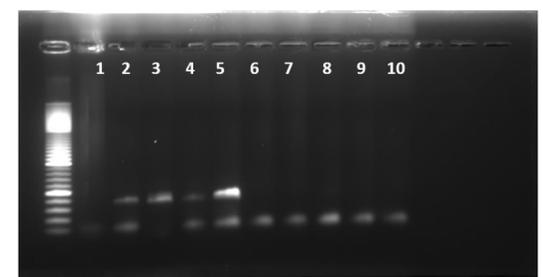


Imagen 3. Gel de agarosa, muestras 2,3,4,5 correspondientes a productos qPCR Positivas.

#### CONCLUSIÓN

Los diversos experimentos realizados fueron trascendentales para la estandarización de una técnica de altos índices de sensibilidad y especificidad para detección molecular de estos agentes bacterianos.

#### VISIÓN Y PLANES FUTUROS

Culminar la tesis doctoral e implementación de la técnica molecular desarrollada para determinar presencia de bacterias de la familia Anaplasmataceae, en especial en personas con riesgo ocupacional. Además de generar una red de trabajo interinstitucional para fomentar investigaciones futuras.

“Esta estancia de investigación fue cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con recursos del FEEI”