

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Estandarización de un sistema de detección de hemoparásitos en *Gallus
gallus domesticus*

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Nombre de la titulación

Biólogo

Presentado por:

Nathaly Rayzza Almeida Rosales

Alyssa Nicole Suárez Rodríguez

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

A mi amada abuela, cuya guía y sabiduría han sido una fuente constante de inspiración, y a mi familia y amigos, especialmente a mis compañeros de la carrera Byron y María Belén, quienes me han brindado apoyo y aliento a lo largo de mi formación profesional como Bióloga. Su confianza en mí ha sido un motor y estoy profundamente agradecida con todos y cada uno de ustedes. Gracias por ser parte de mi vida y hacer posible este logro.

Alyssa Nicole Suárez Rodríguez

A mi familia, amigos y a mis queridas mascotas, quienes han sido mi apoyo incondicional durante este proceso, también a aquellas personas que, aunque ya no forman parte de mi vida, me brindaron su amor y han dejado su huella en mi vida. Gracias por creer en mí, por ser mi luz en los momentos difíciles y por estar a mi lado en cada paso. Ha llegado el momento, la canción ha terminado...pensaba que tendría algo más que decir.

Nathaly Rayzza Almeida Rosales

AGRADECIMIENTOS

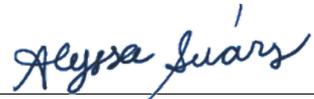
Nos gustaría expresar nuestra profunda gratitud a nuestros profesores Paolo Piedrahita y Efrén Santos, quienes nos brindaron su orientación, apoyo a lo largo de nuestra trayectoria académica. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para dar forma a nuestra investigación y ayudarnos a llevar a buen término este proyecto integrador. También agradecemos a la ESPOL, que nos ha brindado los recursos y las oportunidades necesarias para continuar con nuestros estudios y alcanzar este importante hito.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Nathaly Rayzza Almeida Rosales y Alyssa Nicole Suárez Rodríguez y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Nathaly Rayzza Almeida
Rosales



Alyssa Nicole Suárez
Rodríguez

EVALUADORES

Diego Arturo Gallardo Polit

PROFESOR DE LA MATERIA

Paolo Michael Piedrahita Piedrahita

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

Los hemoparásitos son un problema importante en la industria avícola en la región tropical debido a su capacidad para causar enfermedades graves en aves domésticas, afectando negativamente la producción de carne y huevos, la seguridad alimentaria y la salud pública. Actualmente, la identificación de estos parásitos es un desafío debido a las limitaciones de los métodos actuales de detección. Por lo tanto, se requiere estandarizar un proceso de identificación más eficiente, preciso y confiable para mejorar la seguridad alimentaria y la salud pública. En Ecuador, el sector avícola es un motor económico importante, por lo que, la presencia de hemoparásitos en las aves puede tener un impacto significativo en la producción y calidad de la carne y huevos y representar un riesgo para la salud pública. El objetivo general del proyecto es establecer un proceso de detección de hemoparásitos en *Gallus gallus domesticus* mediante la evaluación de diferentes técnicas, con el fin de mejorar la precisión y confiabilidad del diagnóstico y reducir el posible impacto de los hemoparásitos en la industria avícola. Se realizó un estudio en la Granja Experimental en ESPOL, Guayaquil. Se hizo un análisis previo de los pollos para determinar sus condiciones físicas, incluyendo el estado nutricional y características externas como el peso y las plumas. Se obtuvieron 24 muestras de sangre de 12 pollos, de estas 12 se utilizaron para detección de hemoparásitos mediante microscopía convencional y 12 para PCR. En la microscopía, se identificaron *Plasmodium* spp. y *Leucozytozoon* spp. con una prevalencia de 83.33% y 50% respectivamente. Mediante PCR se identificó la presencia de las especies *P. gallinaceum* y *L. sabrazesi* con prevalencias de 33.33% y 8.33% respectivamente. La técnica de microscopía detectó hemoparásitos de los géneros *Leucocytozoon* y *Plasmodium*, pero tiene poca especificidad y requiere un tiempo largo y un especialista para su identificación. La alta prevalencia de hemoparásitos en las aves estudiadas puede deberse a condiciones geográficas y de gestión del área de crianza de las aves. Los resultados sugieren que la microscopía y la PCR deben ser consideradas complementarias en estudios sobre hemoparásitos.

ABSTRACT

Hemoparasites are a major problem in the poultry industry in the tropical region due to their ability to cause severe diseases in domestic birds, negatively affecting meat and egg production, food safety, and public health. Currently, the identification of these parasites is a challenge due to the limitations of current detection methods. Therefore, standardizing a more efficient, accurate, and reliable identification process is required to improve food safety and public health. In Ecuador, the poultry sector is an important economic engine, so the presence of hemoparasites in birds can have a significant impact on the production and quality of meat and eggs and represent a risk to public health. The overall objective of the project is to establish a process for detecting hemoparasites in *Gallus gallus domesticus* by evaluating different techniques, in order to improve the accuracy and reliability of the diagnosis and reduce the possible impact of hemoparasites on the poultry industry. A study was carried out at the Experimental Farm in ESPOL, Guayaquil. A preliminary analysis of the chickens was done to determine their physical conditions, including their nutritional status and external characteristics such as weight and feathers. 24 blood samples were obtained from 12 chickens, of which 12 were used for hemoparasite detection by conventional microscopy and 12 for PCR. Microscopy identified *Plasmodium* spp. and *Leucozytozoon* spp. with a prevalence of 83.33% and 50% respectively. PCR identified the presence of the species *P. gallinaceum* and *L. sabrazesi* with prevalences of 33.33% and 8.33% respectively. The microscopy technique detected hemoparasites of the genera *Leucozytozoon* and *Plasmodium*, but it has low specificity and requires a long time and a specialist for its identification. The high prevalence of hemoparasites in the studied birds may be due to geographical and management conditions of the bird breeding area. The results suggest that microscopy and PCR should be considered complementary in studies on hemoparasites.

INDICE GENERAL

RESUMEN.....	VI
<i>ABSTRACT</i>	VII
INDICE GENERAL	VIII
ABREVIATURAS	X
SIMBOLOGÍA	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
ÍNDICE DE Tablas.....	XIII
CAPÍTULO 1	14
1. Introducción.....	14
1.1. Descripción del problema	14
1.2. Justificación del problema	14
1.2.1. Objetivo General	15
1.2.2. Objetivos Específicos.....	15
1.3. Marco teórico.....	15
Hemoparásitos	15
Enfermedades causadas por hemoparásitos	16
Métodos de diagnostico	16
2. Metodología.....	17
2.1. Área de estudio	17
2.2. Análisis físico.....	17
2.3. Toma de muestras.....	18
2.4. Microscopia	18
2.4.1. Frotis sanguíneo	18
2.4.2. Tinción	19
2.4.3. Análisis.....	19

2.5. Técnicas moleculares.....	20
2.5.1. Extracción de ADN.....	20
2.5.2. PCR	22
2.5.3. Electroforesis	23
2.5.4. Análisis.....	23
3. Resultados Y ANÁLISIS	24
3.1. Toma de muestras.....	24
3.2. Microscopia	24
3.3. Prevalencia.....	26
3.4. Extracción de ADN	27
3.5. PCR.....	28
3.6. Prevalencia.....	30
CAPÍTULO 4.....	31
4. Conclusiones Y Recomendaciones	31
Conclusiones	31
Recomendaciones	32

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
ddH ₂ O	Agua desionizada y destilada
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
et al	y otros
GEA	Granja Experimental Agrícola
NaCl	Cloruro de sodio
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PVP	Polivinilpirrolidona
Spp	species pluralis
TAE	Tris Acetato EDTA
Tris	(hidroximetil) aminometano
Tris - HCL	Tris-cloruro

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Celsius
32G	32 gauge
bp	Par de bases
Cm	Centímetros
f-r	Forward-Reverse primers
g	Gramos
M	Molar
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mM	Milimoles
ng	Nanogramos
nt	Nucleótidos
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
V	Voltios
μl	Microlitros
μM	Micromoles

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Mapa de la Granja Experimental en Guayaquil	17
Figura 3.1: Observación microscópica de parásitos <i>Plasmodium</i> spp. en muestra #1024	
Figura 3.2: Observación microscópica de parásitos <i>Leucozytozoon</i> spp. en muestra #2	25
Figura 3.3: Resultados de la identificación de hemoparásitos por PCR en gel de electroforesis	28
Figura 3.4: Ladder de ADN de 100 bp	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Composición del buffer CTAB para extracción de ADN.....	20
Tabla 3.1: Detección de Infecciones por <i>Plasmodium</i> y <i>Leucozytozoon</i> en muestras de Sangre de <i>Gallus gallus domesticus</i> por medio de microscopía	26
Tabla 3.2: Concentración de ADN en las muestras de extracción.....	27
Tabla 3.4: Detección de Infecciones por cuatro especies de hemoparásitos en Muestras de Sangre de Pollo	30

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

Los hemoparásitos son un problema latente en la industria avícola, estos pueden causar graves enfermedades en aves domésticas como *Gallus gallus domesticus* y por lo tanto pueden afectar negativamente a la producción de carne y huevos, la seguridad alimentaria y la salud pública (Marín Gómez & Benavides Montaña, 2007). Además, estos parásitos son transmitidos por insectos hematófagos que prosperan en climas cálidos y tropicales como los de nuestra región (Venegas, 2015). No obstante, la identificación precisa de los hemoparásitos es un desafío debido a las limitaciones de los métodos actuales de detección, como la microscopía. Estos métodos pueden ser insuficientes en términos de sensibilidad y especificidad, ya que los hemoparásitos presentan características similares bajo el microscopio durante ciertas etapas de desarrollo (Thi Xuan, y otros, 2021). Por lo tanto, es fundamental estandarizar un proceso de identificación de hemoparásitos que sea más eficiente, preciso y confiable, para mejorar la seguridad alimentaria y la salud pública.

1.2. Justificación del problema

En Ecuador, durante el año 2022, se registró una producción avícola de 263 millones de pollos destinados al consumo humano, 1379 millones de ponedoras comerciales y 3812 millones de huevos (Cooperación Nacional de Avicultores del Ecuador, 2022), por lo tanto, el sector avícola es uno de los principales motores económicos del país. La presencia de hemoparásitos en las aves puede impactar significativamente en la producción y calidad de la carne y huevos (Marín Gómez & Benavides Montaña, 2007), además de existir la posibilidad de transmisión de enfermedades a humanos y animales, siendo esto un posible riesgo para la salud pública. Por estos motivos es necesaria la estandarización de un proceso de detección de hemoparásitos.

1.2.1. Objetivo General

Establecer un proceso de detección de hemoparásitos en *Gallus gallus domesticus* mediante la evaluación de diferentes técnicas, con el fin de mejorar la precisión y confiabilidad del diagnóstico de los hemoparásitos en la industria avícola.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la eficacia de la técnica de microscopía en la detección de hemoparásitos en *Gallus gallus domesticus*.
- Comparar la eficacia de la técnica de PCR con la técnica de microscopía en la detección de hemoparásitos en *Gallus gallus domesticus*, con el fin de determinar la técnica más precisa y confiable.
- Determinar la prevalencia de hemoparásitos en las muestras analizadas.

1.3. Marco teórico

Hemoparásitos

El parasitismo es la relación biológica entre organismos donde el parásito se beneficia a costa del organismo hospedador, la parasitosis o enfermedad parasitaria se presenta cuando el equilibrio en esta relación se rompe a favor del parásito provocando una serie de daños a la salud del hospedador. En el desarrollo de estas enfermedades influyen tanto la patogenicidad del parásito, el estado fisiológico del hospedador y las condiciones del medio ambiente (Olalla Herbosa & Tercero Gutierrez, 2011).

Los hemoparásitos o parásitos sanguíneos pertenecen al orden Haemosporida conformado por protistas heteroxenos (Silva Sánchez, Arévalo, Vilorio, & Romero Palmera, 2016). En aves, los hemosporidios son un grupo de parásitos habituales, en la última década se ha descrito una amplia diversidad genética de hemosporidios aviares, sin embargo, los géneros más frecuentes son *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp., y *Leucocytozoon* spp. (González Olvera, Hernández Colina, Santiago Alarcon, Osorio Beristain, & Martínez Maya, 2022). En *Gallus gallus domesticus* se ha detectado la presencia de los hemoparásitos *P. juxtannucleare*, *P. gallinaceum*, *L. sabrazesi* y *L. caullery* (Thi Xuan, y otros, 2021). Los insectos hematófagos del orden Diptera son los principales vectores (Valkiunas, 2004).

Enfermedades causadas por hemoparásitos

El género *Plasmodium* es responsable del paludismo aviar, también conocida como malaria aviar o plasmodiosis. Esta enfermedad afecta a los tejidos sanguíneos de las aves, debilitándolos debido a la ruptura de los esquizontes y resultando en anemia y debilidad. Además, también puede causar la inflamación del hígado y bazo, es decir, hepatomegalia y esplenomegalia, así como hipoglucemia. A menudo, los síntomas de la enfermedad pueden ser discretos, como la fiebre, lo que puede resultar en que la enfermedad pase desapercibida. Sin embargo, en infecciones por *P. juxtannucleare*, los síntomas pueden incluir hipotermia en lugar de fiebre (Venegas, 2015).

La enfermedad conocida como leucocitoozoonosis es causada por los hemoparásitos pertenecientes al género *Leucocytozoon*. Al igual que los parásitos del género *Plasmodium*, estos hemoparásitos atacan a los leucocitos y hematíes en las aves. La infección provoca la destrucción de los eritrocitos, lo que acarrea a la hemólisis intravascular y a la formación de microembolias que bloquean los vasos sanguíneos. Además, la infección también puede provocar necrosis en órganos como el bazo, el hígado y los pulmones. La presencia de la enfermedad puede ser detectada físicamente a través de signos como la palidez de las mucosas y la alteración en el movimiento del ave, que puede comenzar a tambalearse y presentar torticolis debido a las microembolias cerebrales (Venegas, 2015).

Métodos de diagnóstico

El método de detección convencional de la presencia de parásitos en la sangre se realiza a través del examen de frotis sanguíneos periféricos, los cuales se observan bajo microscopía óptica. Sin embargo, la utilización de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) brinda una mayor información sobre la identificación de la especie y linaje del parásito, ya que permite detectar material genético específico a través de la amplificación de fragmentos de ADN (Mejía Restrepo, y otros, 2021).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

2.1. Área de estudio

La Granja Experimental Agrícola (GEA) fue el área escogida para el presente estudio. Esta área escogida se encuentra localizada en las coordenadas -2.140314440184571, -79.96266204797027 dentro del campus de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) en la ciudad de Guayaquil. Este lugar cuenta con una infraestructura que brinda una oportunidad práctica para demostrar los diferentes métodos de riego (aspersión, microaspersión, goteo, nebulización y gravedad) en una variedad de cultivos basados en la ubicación geográfica de la parcela y las necesidades de investigación de universidades y agricultores del país (ESPOL, 2019).

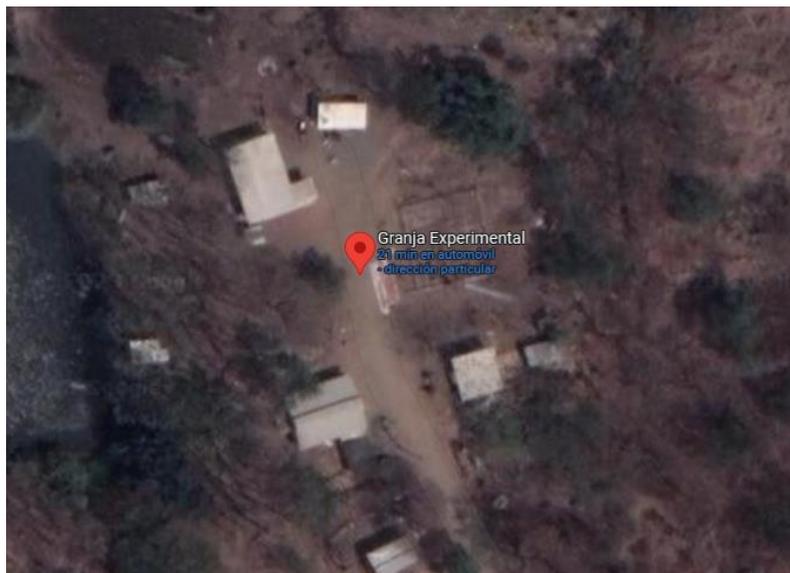


Figura 2.1: Mapa de la Granja Experimental en Guayaquil

2.2. Análisis físico

Antes de realizar la toma de muestra de sangre en los pollos, se llevó a cabo un análisis físico previo con el objetivo de determinar las condiciones generales de los mismos. Se evaluó el estado nutricional mediante la observación de la proporción de grasa abdominal y se registraron las características externas como el peso, la temperatura y las condiciones de las plumas. Esta evaluación se realizó una vez antes de proceder con la toma de muestras. Se recomienda que este análisis incluya la observación de los

aspectos clínicos de cada animal, tales como el estado corporal, la postura, la respiración y el ritmo cardíaco. No existe un criterio de exclusión.

2.3. Toma de muestras

Antes de llevar a cabo la técnica, es indispensable preparar los materiales necesarios, estos son una aguja 32G, un recipiente de vidrio con alcohol al 98%, algodón, tres tubos capilares sin heparina, un microtubo eppendorf de 2 ml con EDTA, un microtubo eppendorf de 2ml con etanol y una placa portaobjeto. La toma de la muestra de sangre se realizó en la nuca del ave entre los dedos índice y anular, esta técnica es conocida como "Agarre del Anillador" o "Bander's grip". Se debe tomar el ala más cercana al dedo índice por la articulación carpal y extenderla, con la finalidad de visualizar las plumas cobertoras, evitando la manipulación inadecuada para prevenir lesiones en el ave. Luego, se procede a limpiar la zona próxima a la vena braquial con una bola de algodón previamente humedecida con alcohol. La punción de la vena braquial se lleva a cabo con una aguja 32G, realizándose de manera paralela a la vena. Posteriormente, se retira la aguja y se extrae la sangre a través del tubo capilar, evitando aplicar presión sobre la punción. Finalmente, se retira el tubo capilar cuando el nivel de sangre haya alcanzado aproximadamente 0.25 cm y se coloca la bola de algodón previamente utilizada sobre la punción, sellando el ala del ave. Se depositó un tubo heparinizado en un microtubo que contiene EDTA, otro en el microtubo que contiene etanol y el último se utilizará para el frotis sanguíneo (Santiago Alarcon & Carbó Ramirez, 2015). Se tomaron 24 muestras de 12 aves sin criterio de exclusión.

2.4. Microscopia

2.4.1. Frotis sanguíneo

Se colocó un portaobjetos sobre una superficie firme. Luego, se depositó el tubo capilar con sangre de manera levemente inclinada, cercana a 90 grados, en la mitad del portaobjetos y se sopló el extremo libre del capilar, para evitar la creación de burbujas. Se colocó un portaobjetos limpio en una dirección de 45 grados sobre la gota de sangre, permitiendo que la sangre se moviera a través del filo del portaobjetos por capilaridad. Posteriormente, se realizó un movimiento firme del portaobjetos en dirección contraria a la sangre. El frotis sanguíneo se puede secar al aire o con la ayuda de un ventilador. Se colocó la placa del frotis sanguíneo en un recipiente con alcohol 98% durante 3 minutos, después de este tiempo se retiró la placa del alcohol y se secó con ayuda de un ventilador. Finalmente, se envolvió la placa del frotis sanguíneo con papel y se almacenó

en un recipiente para su traslado al laboratorio (Santiago Alarcon & Carbó Ramirez, 2015).

2.4.2. Tinción

Se preparó la solución buffer siguiendo las proporciones recomendadas de 1 g de fosfato de sodio dibásico y 0.7 g de fosfato de potasio monobásico por 1000 ml de agua destilada. Se elaboró la preparación de 55 ml de solución buffer, correspondiente a la capacidad de la caja Coplin. Luego, se preparó la solución de trabajo de GIEMSA, utilizando una proporción de 1 ml de colorante GIEMSA por cada 10 ml de solución buffer. La solución de trabajo de GIEMSA se colocó en la caja Coplin y se agregaron los frotis sanguíneos en cada una de sus ranuras. Se esperó 1 hora hasta que se realizó la tinción y posteriormente el sobrante fue desechado. antes de desechar la solución de trabajo de GIEMSA y lavar cada uno de los frotis sanguíneos con agua potable, evitando el contacto directo con el flujo de agua del grifo. Se secaron los frotis o bien con el aire o con un ventilador. Es necesario destacar que la solución de trabajo de GIEMSA no debía utilizarse más de una vez y que debe prepararse para cada grupo de frotis sanguíneos (Santiago Alarcon & Carbó Ramirez, 2015).

2.4.3. Análisis

Se procedió a colocar una placa teñida en el microscopio, utilizando un cubreobjetos. Luego, se realizó una observación con el objetivo de 100x (aceite de inmersión) y se tomó un total de 30 fotografías a campos aleatorios del frotis sanguíneo (Santiago Alarcon & Carbó Ramirez, 2015).

2.5. Técnicas moleculares

2.5.1. Extracción de ADN

Tabla 2.1: Composición del buffer CTAB para extracción de ADN

Extracción de ADN CTAB				
Reactivos	Concentraciones iniciales	Concentraciones finales	Volumen (1ml)	Volumen (8ml)
CTAB	7%	1%	142µl	1136µl
NaCl	5M	1.3M	260µl	2080µl
EDTA (Ph8.0)	0.5M	20mM (0.02M)	40µl	320µl
Tris - HCL (pH 8.0)	1M	100mM	100µl	800µl
PVP (40,000)	---	1.5%	15mg	120mg
β-mercapto etanol	---	0.7%	7µl	56µl
ddH2 O	---		Complete 1ml	3488ml

Se realizó la preparación de 600 µl por muestra de la solución anteriormente descrito en la Tabla 2.1. En tubos de 1.5ml se depositaron 200 µl de muestra con 400 µl de buffer de extracción para cada muestra y se mezclaron en un vortex. Luego, se colocaron los tubos en un baño maría a 65°C durante 30 minutos, con inversión cada 10 minutos. Una vez retirados del baño maría, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 10 minutos a 14.000 rpm/4°C y se retiró el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió 1 volumen (500µl) de cloroformo-isoamilo (24:1) y se agitó por inversión, seguido de una centrifugación adicional de 10 minutos a 14.000 rpm/4°C. Luego, se retiró el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo de 1,5 ml. Se añadió 1 volumen de isopropanol frío y se mezcló invirtiendo el tubo 10 veces. Las muestras se colocaron a -20°C durante la noche. Al día siguiente se llevó a cabo una centrifugación de 10 minutos a 14.000 rpm/4°C, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado una vez con 200 µl de etanol al 70%. Se llevó a cabo una segunda centrifugación bajo las mismas condiciones y se retiró el etanol sin perder el sedimento. El sedimento se secó a temperatura ambiente durante 15-20 minutos para eliminar el exceso de etanol. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µl de agua ultrapura. Durante este proceso, se llevó a cabo un estudio para comparar el efecto de dos soluciones conservantes, EDTA

y etanol, en la preservación de muestras de sangre con el objetivo de optimizar las condiciones para la posterior extracción de ADN. Se evaluó la eficacia de cada solución en la conservación de las propiedades del material genético y se determinó cuál de ellas proporcionaba mejores resultados. La concentración de ADN se midió usando el equipo NanoDrop (Thermo Scientific).

2.5.2. PCR

Tabla 2.2: Características de los primers utilizados

Fuente: (Thi Xuan, y otros, 2021)

Parásito	Nombre y secuencia del cebador (5' a 3')	No. de nt	Tamaño de la ampliación (bp)
Haemosporida	LeucoPlasCox3F: ACACACTTCCCTTCTCGCC	16	At least 1,137
	LeucoPlasCox3R: CCTTTCCGGCTGTTTCC	17	
<i>L. caulleryi</i>	LCCox3F: GCTTTGAACACGAATATATTTTCGTCTAATA	30	1,040
	LCCox3R: GCCTGGAGTTCTTAATCTTGATAGAT	26	
<i>L. sabrazei</i>	LSCox3F: CATATGAGAAACCAATAACAGATGGTATA	29	868
	LSCox3R: ACGCCTGGAGTTCATGTTA	19	
<i>P. juxtannucleare</i>	PJCo3F: CTAAATGTAAATATTCAGTAGCTTGTAATGATC	33	666
	PJCo3R: CAACAATACACGCTATGTTTTTATTATGTA	30	
<i>P. gallinaceum</i>	PGCo3F: TGTAACAAATAATAAAGCTTCTGAAATTATTAATGAT	37	469
	PGCo3R: CCTGGAGTTCTTCATCTAAATTGAA	25	

Tabla 2.3: Composición del Mastermix para PCR

Hemoparásitos PCR			
Reactivos	Concentración	volumen (1x)	Volumen (30x)
Gotaq	1X	10µl	300µl
Lccox3 (f-r)	0.2 µM	0.8µl	240µl
Lscox3 (f-r)	0.2 µM	0.8µl	240µl
Pgcox3 (f-r)	0.2 µM	0.8µl	240µl
Pjcox3 (f-r)	0.2 µM	0.8µl	240µl
Leucoplascox3 (f-r)	0.2 µM	0.8µl	240µl
DdH ₂ O	---	5µl	150µl

Se elaboró el Mastermix según la Tabla 2.3 establecida. A continuación, en cada tubo se agregaron 18 µl del Mastermix elaborado y 2 µl de muestra. Finalmente, los tubos se

depositaron en la termocicladora, bajo diferentes condiciones de temperatura con el objetivo de identificar las condiciones idóneas para la detección de hemoparásitos.

La termocicladora realiza tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión, en la etapa de desnaturalización se usó una temperatura de 95°C por 3 minutos, en la etapa de hibridación se probaron las temperaturas 56°, 58°, 60°, 62° y 64°C por 30 segundos, en la etapa de extensión se usó una temperatura de 72°C por 5 minutos. El proceso total en la termocicladora duró 2 horas en promedio.

2.5.3. Electroforesis

Para la elaboración del gel de agarosa se mezclaron 100ml de TAE y 1.5g de agarosa (1.5%), este es llevado al microondas por lapsos de 30 segundos hasta conseguir un líquido transparente, una vez logrado se adicionan 10µl de SybrSafe, este se vierte en el molde de electroforesis o “caster” con peines de electroforesis para 20 pocillos. Por último, se deja solidificar tapado por 30 minutos aproximadamente.

Una vez solidificado se lleva al tanque de electroforesis, se ubican 3 µl de Ladder de 100bp (Promega, G210A) y 10 µl de muestra y control. Se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje de 100V por un periodo de 30 minutos.

2.5.4. Análisis

Para el análisis se empleó el software Quantity One (Bio-Rad)

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Toma de muestras

Se obtuvieron 24 muestras a partir de 12 pollos, De estas, 12 muestras se utilizaron para llevar a cabo la detección de hemoparásitos mediante la técnica de microscopía convencional, mientras que las otras 12 se destinaron para la realización de la técnica de PCR.

3.2. Microscopia

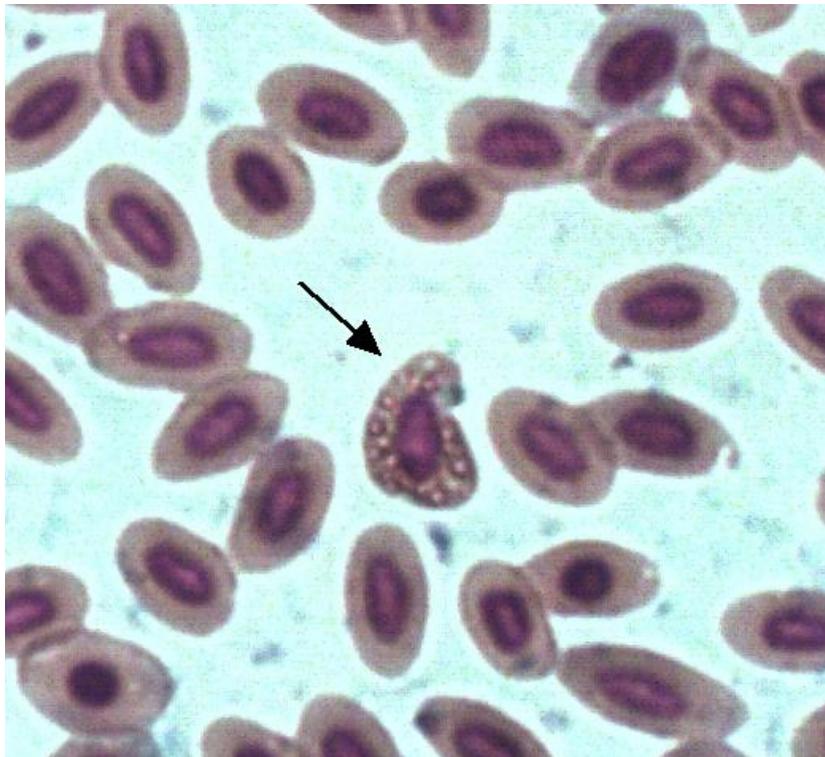


Figura 3.1: Observación microscópica de parásitos *Plasmodium* spp. en muestra #10

La Figura 3.1 muestra un meronto maduro en una célula sanguínea de un ave. Este estadio de desarrollo de *Plasmodium* spp es caracterizado por la presencia de un gran número de merozoitos en el interior de la célula huésped. Los merozoitos son las formas infectantes que se liberan en la sangre y son responsables de la infección de nuevas células sanguíneas. La presencia de merontos maduros indica una fase avanzada de la infección parasitaria (González Galindo, 2013).

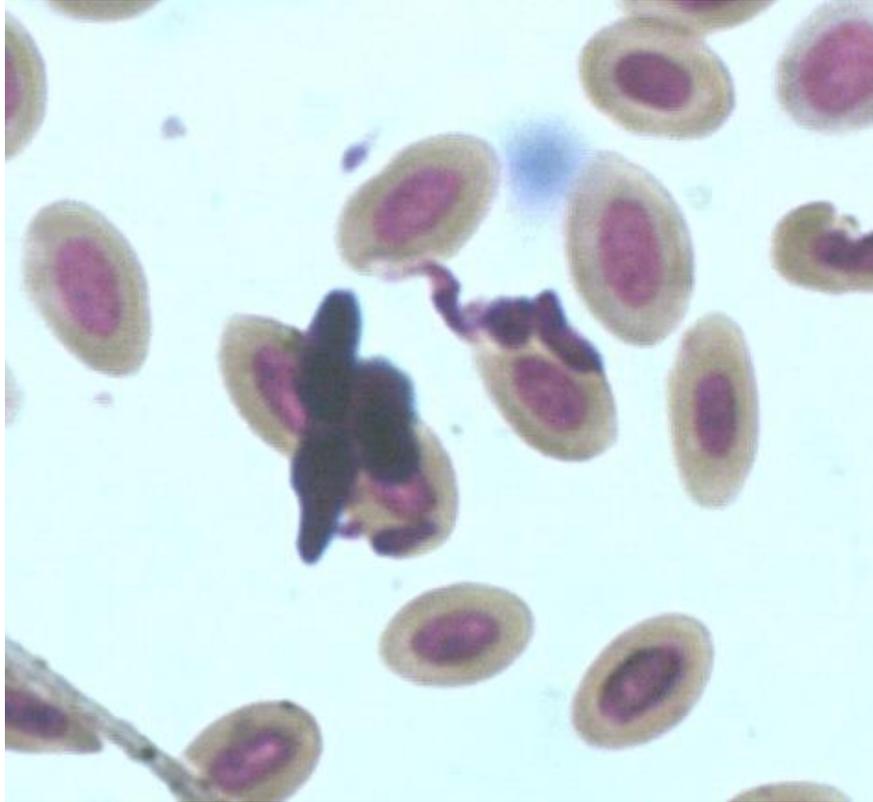


Figura 3.2: Observación microscópica de parásitos *Leucozytozoon* spp. en muestra #2

La Figura 3.2 muestra una visualización de un parásito eritrocítico de la especie *Leucozytozoon*. A través de técnicas de microscopía óptica, se puede apreciar la presencia de estos hemoparásitos en el interior de los eritrocitos, causando su deformación y lisis. Es importante destacar que estos parásitos se alimentan de la hemoglobina de las células sanguíneas, lo que puede llevar a una anemia y un debilitamiento general del huésped (Venegas, 2015).

Tabla 3.1: Detección de Infecciones por *Plasmodium* y *Leucozytozoon* en muestras de Sangre de *Gallus gallus domesticus* por medio de microscopía

Muestra	<i>Plasmodium</i> spp.	<i>Leucozytozoon</i> spp.	Observaciones
1	x	x	Identificación limitada a género. Coinfección
2	x	x	Identificación limitada a género. Coinfección
3	x	-	Identificación limitada a género
4	x	-	Identificación limitada a género
5	x	x	Identificación limitada a género. Coinfección
6	x	x	Identificación limitada a género. Coinfección
7	-	-	No se detectó presencia de hemoparásitos
8	x	x	Identificación limitada a género
9	x	-	Identificación limitada a género
10	x	x	Identificación limitada a género. Coinfección
11	x	-	Identificación limitada a género
12	-	-	No se detectó presencia de hemoparásitos

La Tabla 3.1 muestra los resultados de la detección de hemoparásitos en muestras de *Gallus gallus domesticus*. Mediante la técnica de microscopía se identificó la presencia de *Plasmodium* spp. y *Leucozytozoon* spp. En las muestras 1-2-5-6-8 y 10, se detectaron parásitos de ambos géneros (coinfección), en las muestras 3-4-9 y 11 se identificó únicamente a hemoparásitos del género *Plasmodium*. En las muestras 7 y 12 no se detectó presencia de hemoparásitos. Es importante tener en cuenta que la eficacia de esta técnica también puede verse influenciada por factores como la experiencia del observador, la calidad de las muestras y la preparación previa de las mismas.

3.3. Prevalencia

Para determinar la prevalencia de hemoparásitos se empleó la siguiente fórmula:

Ecuación 3.1: Formula de prevalencia

$$\text{Prevalencia} = \frac{\# \text{ de individuos infectados}}{\# \text{ de individuos totales}}$$

Se calculó la prevalencia de hemoparásitos por género, la prevalencia para *Plasmodium* spp fue de 83.33% mientras que para *Leucocytozoon* spp fue de 50%

3.4. Extracción de ADN

Tabla 3.2: Concentración de ADN en las muestras de extracción

Muestra	Ácidos nucleicos (ng/μl)
1	105.9
2	93.1
3	132.8
4	98.9
5	65.0
6	1399.1
7	326.5
8	259.8
9	306.3
10	61.7
11	139.6
12	100.9

La extracción de ADN se logró utilizando EDTA como conservante de las muestras. EDTA es una molécula que se utiliza para mantener las células vivas y prevenir la coagulación sanguínea. Al agregar EDTA a las muestras de sangre, se logra estabilizar las células y preservar el ADN intacto para su posterior extracción (Vidal Millán & Juárez de los Santos, 2020). En resumen, el uso de EDTA como preservante fue clave en la obtención de resultados confiables y precisos en la extracción de ADN de las muestras de sangre, como se observa en la Tabla 3.2.

3.5. PCR

La Figura 3.3 presenta una imagen de un gel de electroforesis utilizado para identificar hemoparásitos. La imagen muestra las bandas correspondientes a las diferentes muestras de ADN, que han sido separadas por tamaño mediante la aplicación de una corriente eléctrica, se observan las bandas distintas correspondientes a las diferentes muestras, lo que permite identificar la presencia de hemoparásitos en las muestras evaluadas. Se observa la diferencia en los resultados debido a la variación de las temperaturas, las muestras en la parte superior del gel se sometieron a 60° C en la termocicladora mientras que las muestras en la parte inferior estuvieron en condiciones de 64°C y no presentan resultados útiles para la detección de hemoparásitos

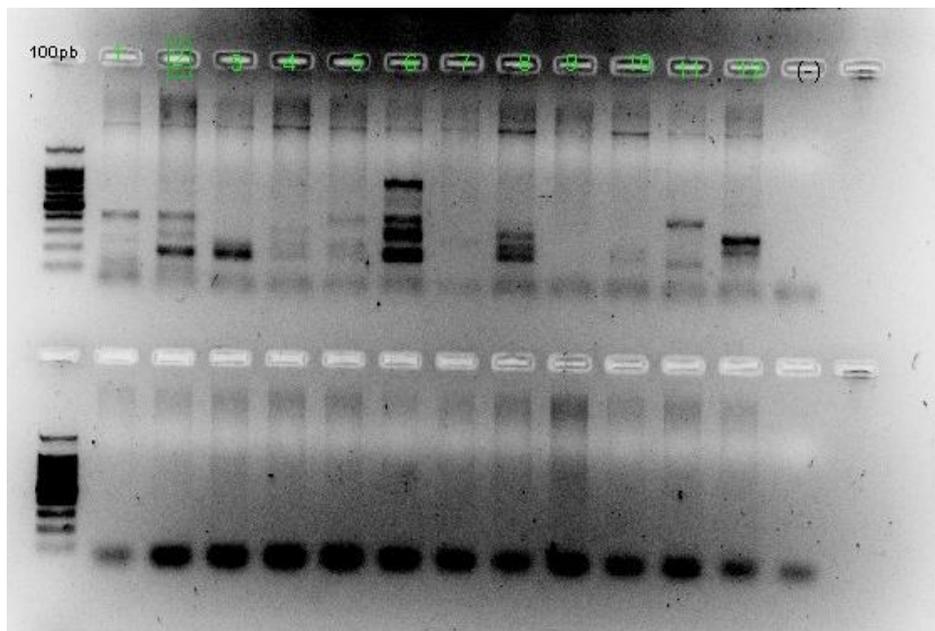


Figura 3.3: Resultados de la identificación de hemoparásitos por PCR en gel de electroforesis

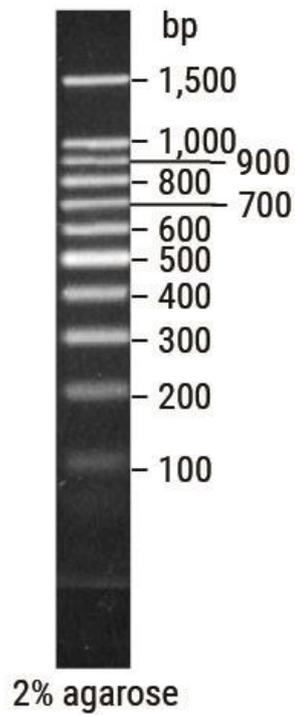


Figura 3.4: Ladder de ADN de 100 bp

En la Figura 3.3 se pueden identificar dos bandas, correspondientes a los tamaños esperados para *P. gallinaceum* y *L. sabrazesi*. Sin embargo, también se observan otras bandas más débiles o de tamaños variables que no coinciden con los tamaños esperados para las cuatro especies de hemoparásitos estudiados. Estos resultados sugieren que además de *Plasmodium gallinaceum* y *Leucocytozoon sabrazesi*, puede haber presencia de otras especies de hemoparásitos en la muestra analizada.

Tabla 3.3: Detección de Infecciones por cuatro especies de hemoparásitos en Muestras de Sangre de Pollo

Muestra	<i>P. gallinaceum</i>	<i>P. juxtannucleare</i>	<i>L. sabrazesi</i>	<i>L. caulleryi</i>
1	x			
2	x			
3				
4				
5				
6	x		x	
7				
8				
9				
10				
11	x			
12				

La Tabla 3.4 muestra los resultados de la identificación de hemoparásitos en muestras de sangre de aves utilizando el método de PCR multiplex. Al comparar los resultados de ambas técnicas podemos destacar que en la muestra 7 no se detectó hemoparásitos bajo ninguna técnica. Es necesario recalcar que los resultados exponen que la PCR es un método más específico y permite la identificación hasta la especie de los hemoparásitos, mientras que la microscopía solo permite la identificación hasta el género. Esto puede explicar las diferencias en los resultados obtenidos entre los dos métodos por lo que es necesario usar ambas técnicas para tener una visión completa de estos patógenos.

3.6. Prevalencia

Se uso la Ecuación 3.1 descrita anteriormente y se calculó la prevalencia por especie de hemoparásito, la prevalencia de *P. gallinaceum* es de 33.33%, de *P. juxtannucleare* es de 0%, de *L. sabrazesi* es de 8.33% y de *L. caulleryi* 0%.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El desarrollo de este proyecto permitió evaluar la eficacia de la técnica de microscopía en la detección de hemoparásitos en *Gallus gallus domesticus*. La técnica de microscopía empleada fue realizada adaptando el protocolo establecido por Santiago Alarcón & Carbó Ramírez (2015). Esta técnica permitió detectar la presencia de hemoparásitos de los géneros *Leucocytozoon* y *Plasmodium* en las células sanguíneas durante sus distintas etapas, sin embargo, esta técnica presentó diferentes desventajas como su poca especificidad, el tiempo largo que debe invertirse por cada placa analizada y la necesidad de contar con un especialista en estos agentes patógenos para su eficaz identificación.
- Dentro de este estudio se buscó la comparación de la técnica de PCR con la técnica de microscopía en la detección de hemoparásitos con el fin de determinar la técnica más precisa y confiable. A pesar de esto, ambas técnicas presentaron diferentes ventajas y desventajas, además, de resultados diferentes puesto que con la microscopía la identificación se realizó hasta el nivel de género, mientras que, la PCR realizada trabajó con 4 especies específicas, por lo que, consideramos que en vez de comparar los resultados obtenidos por ambas técnicas para escoger cuál tendría un rendimiento más óptimo en este tipo de análisis, estas deben ser consideradas como complementarias en estudios sobre hemoparásitos ya que permiten obtener una vista más amplia de la biología de estos agentes patógenos.

- La diferencia de la prevalencia obtenida a través de ambas técnicas puede deberse a que los hemoparásitos observados por microscopía no corresponden a los estudiados en la PCR, sin embargo, ninguno de los resultados obtenidos debería ser desestimado.
- La alta prevalencia de hemoparásitos en aves ha sido descrita en estudios anteriores como el realizado por Lutz et al (2015) en donde se encontró una prevalencia del 79% en las muestras analizadas, asimismo, Hasson et al (2015) encontró que el 70% de las aves de corral estudiadas estaban infectadas con algún tipo de hemoparásitos. Los resultados obtenidos en este proyecto pueden deberse a las diferentes condiciones geo climáticas del área de estudio que favorecen al desarrollo de insectos dípteros vectores de las diferentes especies de hemoparásitos, además, de la gestión de la granja en la que los individuos estudiados residían. Varios estudios confirman mayor prevalencia de hemoparásitos en los pollos jóvenes, lo cual, pueden deberse a una baja inmunidad ya que los órganos inmunes, el timo y la bolsa de Fabricio están en desarrollo, lo que aumenta la posibilidad de contraer una infección con hemoparásitos. Además, hay menos crecimiento de vello en juveniles con piel suave, lo que puede dar acceso para vectores y aumentar el área de superficie para morder fácilmente (Muhammad Ali-ul-Husnain, y otros, 2017).
- El presente estudio servirá como una línea base para el estudio de estos agentes patógenos en las aves de corral, y a su vez, permitirá que a partir de este se realicen diferentes investigaciones que puedan brindar soluciones a una problemática latente dentro de la industria avícola como lo son los hemoparásitos.

Recomendaciones

- Aunque en la actualidad no es conocido el impacto de estos hemoparásitos en la industria avícola, los resultados obtenidos en este y en estudios anteriores podrían indicar que es una problemática que no debe ser desestimada, debido a que, existe evidencia de que ciertas especies como *L. caulleryi* en pollos tiene un tropismo por el tracto reproductivo y está asociado con inflamación y edema del oviducto y disminución de la producción de huevos, además de, hemorragias peritoneales, perirrenales y subdurales con enfermedad grave (Arnaud J, 2022).

- Debido a que los resultados obtenidos por la PCR no fueron concluyentes, se recomienda realizar análisis adicionales para determinar la identidad de las bandas presentes como la secuenciación o amplificación de las regiones amplificadas. Se recomienda además realizar estudios que permitan perfeccionar la técnica de PCR propuesta e incluso implementar técnicas más modernas como la PCR cuantitativa, puesto que, esta técnica permitiría una cuantificación de los agentes patógenos presentes en cada muestra de ADN estudiada.
- Por último, la estandarización de un sistema de detección de hemoparásitos en *Gallus gallus domesticus* puede servir de estudio base para investigaciones en diferentes especies de aves de interés y a su vez, permitirá a diferentes investigadores replicar los protocolos establecidos dentro de este para investigaciones propias.

BIBLIOGRAFÍA

- Arnaud J, V. W. (Octubre de 2022). *Leucocytozoonosis in Poultry*. Obtenido de <https://www.msddvetmanual.com/poultry/bloodborne-organisms/leucocytozoonosis-in-poultry>
- Cooperación Nacional de Avicultores del Ecuador. (2022). *Estadísticas del Sector Avícola*. Obtenido de <https://conave.org/informacion-sector-avicola-publico/>
- ESPOL. (9 de Septiembre de 2019). *Granja Experimental de ESPOL, espacio que beneficia a estudiantes, investigadores y agricultores del país*. Obtenido de <https://www.espol.edu.ec/noticias/granja-experimental-de-espol-espacio-que-beneficia-estudiantes-investigadores-y>
- González Galindo, A. D. (2013). *Diversidad de los hemoparásitos Plasmodium y Haemoproteus en algunas especies de aves de los Andes colombianos*. Tesis de Postgrado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Obtenido de <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/75019/190500.2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- González Olvera, M., Hernández Colina, A., Santiago Alarcon, D., Osorio Beristain, M., & Martínez Maya, J. J. (2022). Blood-parasites (Haemosporida) of wild birds captured at different land uses within a tropical seasonal dry forest matrix. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*, 38, 1-22.
- H., H. R. (2015). Haemosporidians parasites of Gallus domesticus, poultry in Iraq. *International Journal of Advanced Research*, 3(8), 1046-1054.
- Lutz, H. L., Hochachka, W. M., Engel, J. I., Bell, J. A., Tkach, V. V., Bates, J. M., . . . Weckstein, J. D. (8 de Abril de 2015). Parasite Prevalence Corresponds to Host Life History in a Diverse Assemblage of Afrotropical Birds and Haemosporidian Parasites. *PLOS ONE*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121254>
- Marín Gómez, S. Y., & Benavides Montaña, J. A. (julio-diciembre de 2007). Párasitos en aves domésticas (Gallus domesticus) en el Noroccidente de Colombia. *Revista Veterinaria y Zootecnia*, 1(2), 43-51. Obtenido de <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/vetzootec/article/view/5754>
- Mejía Restrepo, J., Carrillo D´Lacoste, L., Jiménez Marín, A., Ojeda Flores, R., Ducoing Watty, A., Limón Civera, D., . . . Ramos Garduño, L. (Abril de 2021). Detección microscópica y molecular de Plasmodium spp. en flamencos (Phoenicopterus ruber) mantenidos bajo cuidado humano en Zoofari, Centro de Conservación,

- Morelos, México. *Journal of Negative & no positive results*, 6(4). doi:DOI: 10.19230/jonnpr.3789
- Muhammad Ali-ul-Husnain, N., Muhammad Kasib, K., Zafar, I., Hafiz Muhammad, R., Muhammad Nisar, K., Sana Zahra, N., . . . Asghar, A. (1 de Agosto de 2017). Prevalence and Associated Risk Factors of Haemoparasites, and Their Effects on Hematological Profile in Domesticated Chickens in District Layyah, Punjab, Pakistan. *Preventive Veterinary Medicine*, 143, 49-53. doi:<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.001>
- Olalla Herbosa, R., & Tercero Gutierrez, M. J. (Julio-Agosto de 2011). PARASITOSIS COMUNES INTERNAS Y EXTERNAS CONSEJOS DESDE LA OFICINA DE FARMACIA. *Offarm*, 30(4), 33-39.
- Santiago Alarcon, D., & Carbó Ramirez, P. (2015). Párasitos Sanguíneos de ;Malaria y Géneros Relacionados (Orden: Haemosporida) en aves de México: Recomendaciones metodológicas para campo y laboratorio. *Ornitología Neotropical*, 26, 59-77. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/277248935_PARASITOS_SANGUINEOS_DE_MALARIA_Y_GENEROS_RELACIONADOS_ORDEN_HAEMOSPORIDA_EN_AVES_DE_MEXICO_RECOMENDACIONES_METODOLOGICAS_PARA_CAMPO_Y_LABORATORIO
- Silva Sánchez, C. J., Arévalo, C., Vilorio, N., & Romero Palmera, J. (diciembre de 2016). Prevalencia de hemoparásitos en aves silvestres, en zona oriental del estado Falcón, Venezuela 2013-2015. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 56(2).
- Thi Xuan, M. N., Kaewlamun, W., Saiwichai, T., Thanee, S., Poofery, J., Tiawsirisup, S., . . . Kaewthamasorn, M. (2021). Development and application of a novel multiplex PCR assay for the differentiation of four haemosporidian parasites in the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Veterinary Parasitology*, 293. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109431>
- Valkiunas, G. (2004). *Avian malaria parasites and other haemosporidia* (Primera ed.). CRC Press.
- Venegas, M. A. (2015). *Hemoparásitos de las aves domésticas en el trópico peruano*. Pucallpa. Obtenido de <http://www.perulactea.com/wp-content/uploads/2018/10/TRIGUEROS-2018-PDF.pdf>
- Vidal Millán, P., & Juárez de los Santos, P. (2020). *Manual de Laboratorio de Hematología*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios

Superiores Zaragoza. Obtenido de https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/manuales/4_MANUAL_LABORATORIO_HEMATOLOGIA_2020.pdf