



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETECCIÓN DE ADN MITOCONDRIAL BOVINO EN PIENSOS COMO
PARTE DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA DE LA ENCEFALOPATÍA
ESPONGIFORME BOVINA EN ECUADOR.

AUTOR

Adriana Alejandra Gordon Ayala

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETECCIÓN DE ADN MITOCONDRIAL BOVINO EN PIENSOS COMO
PARTE DEL PROGRAMA DE VIGILANCIA DE LA ENCEFALOPATÍA
ESPONGIFORME BOVINA EN ECUADOR.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología.

Profesor Guía

MSc. María Gabriela Granja Bastidas

Autora

Adriana Alejandra Gordon Ayala

Año

2018

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Detección de ADN mitocondrial bovino en piensos como parte del programa de vigilancia de la Encefalopatía espongiforme bovina en Ecuador, a través de reuniones periódicas con la estudiante Adriana Alejandra Gordon Ayala, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

María Gabriela Granja Bastidas

Máster en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina

Especialidad: Patología Molecular

CC: 1712995149

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Detección de ADN mitocondrial bovino en piensos como parte del programa de vigilancia de la Encefalopatía espongiforme bovina en Ecuador, de la estudiante Adriana Alejandra Gordon Ayala, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

Wilson David Tapia López

Magister en Gestión y Planificación Ambiental

CC: 1714205281

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Ana Dolores Garrido Haro
Máster en Biología Molecular
CC: 1718496928

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaró que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Adriana Alejandra Gordon Ayala

CC: 1720111606

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi guía espiritual y permitirme alcanzar tan anhelada meta.

A mi familia por ser el pilar fundamental para cumplir todos mis sueños.

A los técnicos del Laboratorio de Biología Molecular y Laboratorio de Virología de AGROCALIDAD, por brindarme todo el apoyo y soporte técnico para la realización del presente proyecto.

A mis docentes Gabriela Granja y Wilson Tapia, por guiarme constantemente en el desarrollo de este proyecto.

DEDICATORIA

A mis padres, quienes han guiado con mucho amor y sabiduría cada etapa de mi vida, brindándome ánimos y fuerza para no desfallecer en mis objetivos.

A mis hermanos, por aportarme sus sabios consejos para superar cada obstáculo que se ha ido presentando en este gran sueño.

A mis sobrinos, por llenar mis días de amor y felicidad con cada una de sus ocurrencias.

RESUMEN

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es una afección progresiva, degenerativa y fatal del Sistema Nervioso Central (SNC), conocida comúnmente como la enfermedad de las vacas locas. Se transmite por alimentar a los bovinos con harinas y piensos que contienen restos de animales enfermos, por lo cual es importante una rápida detección de residuos bovinos en los alimentos balanceados, con el fin de mantener un programa de vigilancia de la EEB y evitar una posible aparición de la enfermedad en el Ecuador. El presente proyecto consistió en la determinación del mejor método de extracción de ADN mitocondrial, para lo cual se empleó un método tradicional con tiocianato de guanidinio y un método comercial por columnas *foodproof Sample Preparation Kit III BIOTECON Diagnostics*, determinando que el método comercial es el más eficiente, además se evaluó las condiciones óptimas para la estandarización de la PCR convencional en donde se empleó cebadores específicos que amplifican una región altamente conservada del ADN mitocondrial bovino específicamente el gen *CYTB* citocromo b, también se realizaron ensayos de sensibilidad y especificidad analítica de los cebadores, dando como resultado que son altamente específicos para la especie bovina, con un límite de detección de 0,05% de restos bovinos en alimentos balanceados. La implementación de este proyecto permite una rápida detección de restos bovinos en piensos, enfocado en el cumplimiento de la normativa de AGROCALIDAD Resolución 088, la misma que prohíbe en todo territorio nacional la utilización de harinas nacionales o importadas de carne, sangre y huesos de rumiantes para la alimentación de rumiantes o de alimentos para rumiantes que contengan estos productos, con el propósito de que Ecuador obtenga una certificación de ser un país libre de EEB.

Palabras Claves: EEB, SNC, Piensos, ADN mitocondrial, *CYTB* citocromo b

ABSTRACT

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) is a progressive and degenerative disease of the nervous system commonly known as mad cow disease. The route of transmission is by the digestive system due to feeding with flours and feeds containing remains of sick animals, therefore is important a prompt detection of bovine remains in balanced feed, in order to maintain a surveillance program of the BSE and to avoid a possible appearance of this disease in Ecuador. The present project consisted in the determination of the best method of extraction of mitochondrial DNA, for which a traditional method with guanidinium thiocyanate and a commercial method by columns called Diagnostics-foodproof® Sample Preparation Kit III were used, determining that the commercial method is the most efficient. In addition, the optimal conditions for the standardization of conventional PCR were evaluated, specific primers that amplify a highly conserved region of the Bovine mitochondrial DNA were used, specifically CYTB cytochrome b, sensitivity and analytical specificity assays of the primers were also carried out, turning out to be highly specific for the bovine species, with a detection limit from 0.1% to 0.05% of bovine residues in food balanced. The implementation of this project allows a quick detection of bovine remains, constituting an adequate measure to comply with AGROCALIDAD regulations in accordance with Resolution 088, which prohibits in the entire national territory, the use of national or imported flours made out of meat, blood and bones of ruminants for the feeding of ruminants or food for ruminants containing these products and by this way make it possible for Ecuador to be declared as a country free of bovine spongiform encephalopathy.

Key words: BSE, CNS, Fodder, mitochondrial DNA, CYTB cytochrome b

ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Justificación de la investigación	6
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs).....	7
2.1.1. Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB).....	9
2.1.1.1. Etiología.....	9
2.1.1.2. Transmisión	11
2.1.1.3. Prevalencia e incidencia	12
2.1.1.4. Signos clínicos	13
2.1.1.5. Diagnóstico de la enfermedad.....	13
2.1.1.6. Riesgos para la salud publica	17
2.2. Alimentación del ganado bovino	18
2.2.1. Definición de pienso (alimento para animales)	19
2.2.2. Ingredientes de los piensos	19
2.2.3. Composición nutricional de los piensos	19
2.2.4. Normativa para elaboración de piensos destinados a la alimentación del ganado bovino	20
2.3. Vigilancia de la EEB	21
2.3.1. Medidas de prevención de la EEB	21
2.3.2. Estatus de riesgo de EEB.....	21
2.3.3. Programas de vigilancia de la EEB.....	23
2.3.4. Vigilancia activa y pasiva de la EEB en el Ecuador	24

2.3.5. Detección de ADNm de bovino en piensos destinados para la alimentación del ganado.....	24
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL	25
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS	27
4.1. Población y muestra.....	27
4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos.....	27
4.2.1. Elaboración de Controles positivos.....	27
4.2.1.1. Controles positivos de harina de hueso fresco bovino.....	27
4.2.1.2. Controles positivos de sangre de bovino.....	28
4.2.2. Contaminación de pienso con harina de hueso fresco molido.....	28
4.2.3. Métodos de extracción de ADN mitocondrial.....	28
4.2.3.1. Metodología según Boom et al., (1990, pp. 495-503)......	28
4.2.3.2. Extracción de ADN mitocondrial bovino mediante un juego comercial de extracción.....	29
4.2.4. Cuantificación de ADN mitocondrial por espectrofotometría.....	31
4.2.5. Cebadores.....	31
4.2.6. Protocolo de PCR convencional optimizado para la detección de una región conservada del genoma mitocondrial bovino.....	32
4.2.6.1. Optimización de la temperatura de alineamiento.....	34
4.2.6.2. Optimización de la concentración de cebadores.....	34
4.2.6.3. Optimización de la concentración de MgCl ₂	35
4.2.7. Visualización de los productos de PCR por electroforesis.....	36
4.2.8. Criterios de aceptación o rechazo de los resultados.....	36
4.2.9. Verificación de la integridad de controles positivos.....	37
4.2.10. Determinación de la sensibilidad analítica.....	37
4.2.10.1. Límite de detección en piensos infectados con harina de hueso fresco bovino.....	37
4.2.10.2. Límite de detección por diluciones seriadas.....	38
4.2.11. Determinación de la especificidad.....	38
5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1. Extracción de ADN mitocondrial.....	39

5.1.1. Comparación de dos métodos de extracción por absorbancia y cuantificación	39
5.1.2. Comparación de dos métodos de extracción por medio de la obtención de controles positivos.....	40
5.1.3. Comparación de dos métodos de extracción por la sensibilidad analítica.....	42
5.2. Estandarización de la PCR para la detección de ADN mitocondrial bovino	44
5.2.1. Optimización de la temperatura de alineamiento.	44
5.2.2. Optimización de la concentración de cebadores	46
5.2.3. Optimización de la concentración de MgCl ₂	49
5.3. Verificación de la integridad de los controles positivos	51
5.4. Sensibilidad analítica	51
5.5. Especificidad analítica	53
5.6. Validación de la PCR con muestras de campo	54
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
6.1. Conclusiones	56
6.2. Recomendaciones.....	56
REFERENCIAS	58
ANEXOS	65

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) fue diagnosticada por primera vez en Reino Unido en noviembre de 1986 y se ha extendido por Asia, Europa, Oriente Medio (Israel) y Norteamérica. Entre 1987 y 2007, Reino Unido confirmó más de 180000 casos que conforman el 97% del total de reportados en el mundo. Canadá notificó su primer caso en mayo del 2003, Estados Unidos en diciembre del 2003, Francia en enero del 2005 y hasta la fecha no se han reportado casos en Ecuador (OIE, 2016, pp. 1-6).

La EEB es una afección progresiva y degenerativa del sistema nervioso conocida comúnmente como enfermedad de las “vacas locas”, debido a la sintomatología que presenta como son los cambios en el comportamiento; nerviosismo, agresividad, depresión, alteraciones en la locomoción, descoordinación, sensibilidad, pérdida de peso, disminución de la producción lechera, hipersensibilidad a los ruidos y a la luz, y a medida que avanza la enfermedad termina por ocasionar la muerte (Eigen, 2001, pp.1-4).

Investigaciones realizadas han concluido que esta afección se transmite principalmente por alimentar al ganado con harinas, desechos y piensos que contienen restos de animales enfermos. Cabe mencionar que se ha encontrado un pequeño porcentaje de casos de transmisión vertical es decir de madre a hijo de tipo placentario, pero esta es menor al 1 %, por lo que llevar un control en la alimentación del ganado es el factor más trascendental para evitar futuras epidemias de esta enfermedad (Rubio y Verdecia, 2009, pp.1-13).

La EEB se transmite por medio de piensos que han sido elaborados con restos de animales infectados, los mismos que contienen una proteína anormal denominada príon, la cual tiene la capacidad de transformar las proteínas celulares normales predominantemente en el Sistema Nervioso Central (SNC)

en priones patógenos, debido a un cambio en la conformación de la proteína celular, pero manteniendo la misma secuencia aminoacídica (Eigen, 2001, pp.1-4). La proteína patógena se empieza a acumular dentro de las células nerviosas produciendo lesiones como vacuolas, lo que le confiere un aspecto de esponja (Deborah, 2004, pp.1-5). La proteína priónica anómala no solo afecta al sistema nervioso, sino que además interfiere con el sistema inmune ocasionando daños en la señalización bioquímica de la activación de linfocitos T bovinos (Pinto et al., 2015, pp.50-57).

La aparición de la encefalopatía espongiforme en el ganado bovino y su posterior transmisión al ser humano han convertido a esta enfermedad en prioritaria para la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), por lo que varios países comenzaron a desarrollar estudios de riesgo y programas de vigilancia de la EEB. Dentro de estos programas está la detección de restos bovinos en piensos destinados a la alimentación del ganado (Pinto et al., 2015, pp.50-57).

La metodología para la detección de ADN mitocondrial bovino en piensos requiere de un proceso óptimo de extracción de este material genético para la posterior amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional estandarizada. Diversas técnicas de extracción han sido reportadas en fuentes bibliográficas, de las cuales el método tradicional que se basa en las propiedades de unión del ADN a partículas de sílice en presencia de tiocianato de guanidinio (GuSCN) ha sido uno de los empleados. Sin embargo, también se emplean métodos de extracción comercial que permiten obtener un ADN de mejor calidad, más estable y con un menor tiempo de procesamiento de la muestra a pesar de sus altos costos (Boom et al., 1990, pp. 495-503).

La PCR ha sido reportada en literatura como una de las mejores técnicas para la identificación de restos bovinos en alimentos balanceados, por presentar una alta sensibilidad, la cual se consigue al evaluar piensos infectados con restos bovinos en diferentes proporciones (2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%). Los cebadores empleados amplifican una región altamente conservada del genoma

mitocondrial de la especie bovina (Corona et al., 2007, pp.312-317). Esta metodología ha resultado ser una herramienta eficaz y rápida de diagnóstico en alimentos balanceados para bovinos (Corona et al., 2007, pp.312-317; Farías, Garcés, Larenas, Ramírez y Lecocq, 2011, pp.1-10).

Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) como medida de prevención de la transmisión de la enfermedad EEB, ha dispuesto de acuerdo a la Resolución 088 actualizada el 12 de septiembre del 2016:

“Prohibir en todo el territorio nacional la utilización de harinas nacionales o importadas de carne, sangre y huesos de rumiantes para la alimentación de rumiantes o de alimentos para rumiantes que contengan estos productos. Se prohíbe la importación y comercialización de harinas de carne, huesos y sangre de rumiantes para alimentación de rumiantes o alimentos que contengan estos productos desde países afectados por la presencia de la EEB y el Prurigo Lumbar Ovino (scaprie)” (AGROCALIDAD, 2016, p.1).

El cumplimiento de esta normativa permitirá a Ecuador obtener la certificación de ser un país con riesgo insignificante de EEB dentro de la OIE, con el propósito de aumentar el comercio internacional de ganado bovino.

Ecuador emplea como metodología de diagnóstico de la EEB la técnica de Western Blot en homogenatos de cerebro bovino. Esta técnica se realiza como parte de un monitoreo constante en todo el país desde octubre del 2014 hasta la actualidad, con el objetivo de mantener programas de vigilancia de la EEB, para evitar una posible aparición de la enfermedad en el Ecuador y generar un aseguramiento de la calidad ganadera (Pinto et al., 2015, pp. 50-57).

1.2. Planteamiento del problema

La EEB es una enfermedad zoonótica, es decir que puede ser transmitida de los animales al ser humano, la misma que se genera por el consumo de animales infectados que no han sido monitoreados y por la falta de óptimos programas de vigilancia, lo que ha ocasionado un alto impacto social por el riesgo que implica para la salud pública y un impacto económico por las pérdidas en el comercio de animales y sus derivados (Toro et al., 2005, pp.1-29).

Es preocupante saber que la EEB desde su primera aparición en Reino Unido en 1986, se ha extendido por Asia, Europa, Oriente Medio y Norteamérica. Entre 1987 y 2007, Reino Unido confirmó más de 180000 casos, también se reportan problemas en países como: Canadá, Estados Unidos, Francia y Brasil. La prevalencia de EEB es muy variable, en algunos países se estima que puede llegar a ser de hasta 100 por cada millón de cabezas de ganado, en otros países podría estimarse menos de dos casos por cada millón, siendo estos últimos países clasificados como de riesgo mínimo para EEB por la OIE.

Ecuador de acuerdo con la actualización de mayo del 2017, respecto a la lista de países con riesgo insignificante de la OIE no forma parte de este grupo, por no tener un programa de vigilancia de la EEB respecto al control de los piensos, esto ha ocasionado un impacto económico en el comercio internacional de animales y sus derivados, ya que al no contar con la certificación de ser un país libre o con riesgo insignificante de la EEB otorgado por la OIE y la Organización Mundial de la Salud (OMS) no puede exportar este tipo de carne (OIE, 2017, pp.1-6).

Es alarmante que no exista en la actualidad ningún tratamiento o vacuna para esta enfermedad, sabiendo que es altamente peligrosa para el ser humano. Además, cabe recalcar que no existe hasta la actualidad ningún método de diagnóstico que no requiera el sacrificio del animal, lo que genera grandes pérdidas económicas para los productores (Pinto et al., 2015, pp. 50-57). La OIE

y la OMS han exhortado a los países a implementar medidas sanitarias para evitar que la enfermedad ingrese a varios territorios y se propague masivamente por todo el mundo (Toro et al., 2005, pp.1-29).

Ecuador es un país en donde la ganadería y la producción lechera representan importantes aportaciones económicas al producto interno bruto (PIB) del país y es alarmante que el país no cuente con un programa de vigilancia para evitar la aparición de la EEB; como se ha reportado en otros países, los cuales cuentan con métodos de diagnóstico moleculares eficientes y rápidos para la detección temprana de piensos contaminados con restos bovinos, siendo esta metodología esencial para un control eficiente de la fuente potencial de transmisión de la enfermedad (Corona et al., 2007, pp. 312-317; El telégrafo, 2017, p.1; Farías; Garcés, Larenas, Ramírez y Lecocq, 2011, pp.1-10).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Implementar una metodología de diagnóstico para la detección de ADN mitocondrial bovino en piensos utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar las condiciones para la estandarización de una PCR para la detección de ADN mitocondrial bovino.
- Evaluar el método más eficiente para la extracción de ADN mitocondrial bovino en piensos destinados a la alimentación del ganado.
- Establecer el límite de detección (sensibilidad) y especificidad analítica con la PCR estandarizada.

1.4. Justificación de la investigación

Este proyecto es de gran importancia para el Ecuador, ya que, al incluir una metodología de detección de restos bovinos en piensos, permitirá llevar a cabo un adecuado control tanto de las materias primas empleadas en la elaboración de alimentos balanceados, así como de los piensos producidos en el país y de los importados, los cuales son una fuente potencial de transmisión de la enfermedad. Además, este estudio permitirá establecer un programa de vigilancia de la EEB, con el fin de evitar la introducción de la enfermedad al país reduciendo significativamente un posible problema de salud pública debido a su naturaleza zoonótica.

La implementación de esta metodología como estrategia diagnóstica de restos bovinos en alimentos balanceados es sumamente importante, para dar cumplimiento a la Resolución 088 de AGROCALIDAD. La cual prohíbe en todo el territorio nacional la utilización de harinas nacionales o importadas de carne, sangre y huesos de rumiantes para la alimentación de rumiantes o de alimentos para rumiantes que contengan estos productos (AGROCALIDAD, 2016, p.1).

Ecuador, al introducir esta metodología de diagnóstico y al no presentar ningún caso confirmado de esta enfermedad en el país podría formar parte del grupo de países con riesgo insignificante de presentar EEB dentro de la OIE y, por otra parte, esto permitiría obtener la certificación de la OIE y de la OMS de ser un país libre de EEB. Esto es muy relevante desde el punto de vista económico ya que generaría incremento en el comercio del ganado bovino y convertiría al Ecuador en un país seguro para la comercialización de estos productos lo que implicaría un aporte significativo al PIB del país y eliminaría la posibilidad de introducir la EEB evitando importantes riesgos para la sanidad animal y la salud pública del país (OIE, 2016, pp. 1-6).

2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs)

Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) o enfermedades priónicas que afectan a los animales y al hombre, tuvieron sus inicios en el siglo XVIII, cuando un grupo de ganaderos en Europa anunciaron una enfermedad neurodegenerativa que afectaba a cabras y ovejas (Velásquez, Villegas, y Rodas, 2010, pp. 240-247). Los animales infectados presentaban cambios en el comportamiento, hipersensibilidad y temblores incontrolables, por lo cual denominaron a la enfermedad como “tembladera” o “scrapie” en inglés, esta enfermedad fue la primera EET diagnosticada en 1730 en Europa, la cual se ha extendido desde entonces por Reino Unido, Oriente Medio, Sudáfrica, Kenia, Estados Unidos y Colombia (OIE, 2016, pp. 1-6).

Las EETs son un grupo de afecciones neurodegenerativas letales y transmisibles, que se generan por un agente patógeno llamado prión (PrP^{sc}), el mismo que fue descubierto en 1982 por Stanley Prusiner, quien después de varios estudios demostró que esta partícula con capacidad infectiva, no poseía ácidos nucleídos, sino que era netamente proteica (Prusiner, 1982, pp.136-144). El prión no patógeno presenta una estructura hélice α , de tipo monomérica y muestra susceptibilidad a proteasas, con un resistencia normal y soluble en detergentes, mientras que el prión patógeno presenta una isoforma aberrante generada por un mal plegamiento de la proteína celular normal del mismo tipo (PrP^c) presente en el organismo hospedero, con mayor cantidad de láminas β (hojas plegadas) (OMS, 2016, p.1).

Las proteínas priónicas celulares normales son sintetizadas adecuadamente por la célula y digeridas por enzimas intracelulares, mientras que las proteínas priónicas modificadas (PrP^{sc}) pierden la actividad biológica lo que ocasiona la apoptosis neuronal del hospedero (Vargas, Salto, Sola, y Hortelano, 2017, pp.5-20). Las PrP^{sc} presentan la misma secuencia de aminoácidos que las PrP^c pero

una estructura tridimensional diferente, proporcionándole una resistencia a la degradación lo que genera una acumulación y transmisión a otras proteínas normales del sistema nervioso central (Pinto et al., 2015, pp. 50-57).

Las EETs se caracterizan por presentar un largo periodo de incubación y lesiones vacuolares fatales e irreversibles en el sistema nervioso central, lo que produce una degeneración esponjosa del cerebro de donde proviene el nombre de espongiforme (OMS, 2016, pp.1). Las EETs generan cambios morfológicos degenerativos, incluyendo una fase psíquica que ocasiona varios cambios en el comportamiento y una fase orgánica, en la que se observan alteraciones motoras peligrosas que desencadenan en la muerte, ya que no existe hasta la actualidad ningún tratamiento para estas afecciones (Farías, Núñez, Padilla, y Goicoechea, 2004, p.1).

Las EETs relacionadas con priones, pueden encontrarse en cualquier tipo de mamíferos ya sean para uso pecuario como: vacas, cabras y ovejas, domésticos: gatos, y en animales salvajes como: ciervos, alces y visones (Pinto et al., 2015, pp. 50-57). De tal forma que se han definido las siguientes clasificaciones dependiendo del hospedero: scrapie en ovejas y cabras, la EEB en bovinos, Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) en gatos y Encefalopatía Transmisible del Visón (EEV) afecta al visón como se puede ver en la Figura 1 (Prusiner, 1982, pp.136-144). En los años noventa se produjo la transmisión de EEB a personas que habían consumido carne contaminada, de esta manera se demostró que la EEB había cruzado la barrera de la especie transformando a la EEB en una enfermedad zoonótica y produciéndose una nueva variante en humanos llamada Creutzfeldt-jacob (Pinto et al., 2015, pp. 50-57).



Figura 1. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs).

Tomado de Collinge, 2001.

Las patologías relacionadas con priones en humanos incluyen a la enfermedad de Kuru que fue diagnosticada por primera vez a mediados del siglo XX la cual afectó a los aborígenes en Nueva Guinea que practicaban el canibalismo, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) la cual presenta tres clases: ECJ hereditaria, ECJ esporádica, y la nueva variante de Creutzfeldt-jacob (vCJD), la cual incluye demencia progresiva y pre-senil (Delgado, Rangel y León, 2002, pp. 69-75; Pinto et al., 2015, pp. 50-57).

2.1.1. Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)

2.1.1.1. Etiología

Los piensos que han sido elaborados con restos de animales infectados contienen una proteína anormal denominada prión (OIE, 2016, pp.1). El prión tiene la capacidad de transformar las proteínas celulares normales PrP^c (la "c" es de celular), las cuales se encuentran predominantemente en las células del SNC, en proteínas patógenas de tipo PrP^{sc} (isoforma scrapie) (Pinto et al., 2015, pp. 50). Dicha transformación se da por un plegamiento erróneo en la proteína normal PrP^c. Cuando PrP^c de 33 a 35 kDa, entra en contacto con la proteína patógena, mantiene la secuencia de aminoácidos, pero genera un cambio conformacional post-traducciona que la transforma en PrP^{sc} sin ninguna alteración en la estructura primaria, generando un incremento en el porcentaje de láminas β como se puede observar en la Figura 2. La PrP^c presenta una estructura secundaria compuesta del 3 % de láminas β y por un 42 % de hélices α , mientras que la proteína patógena PrP^{sc} tiene un 43 % de láminas β y un 30 % de hélices α (Farías, Garcés, Larenas, Ramírez y Lecocq, 2011, pp.1-10).

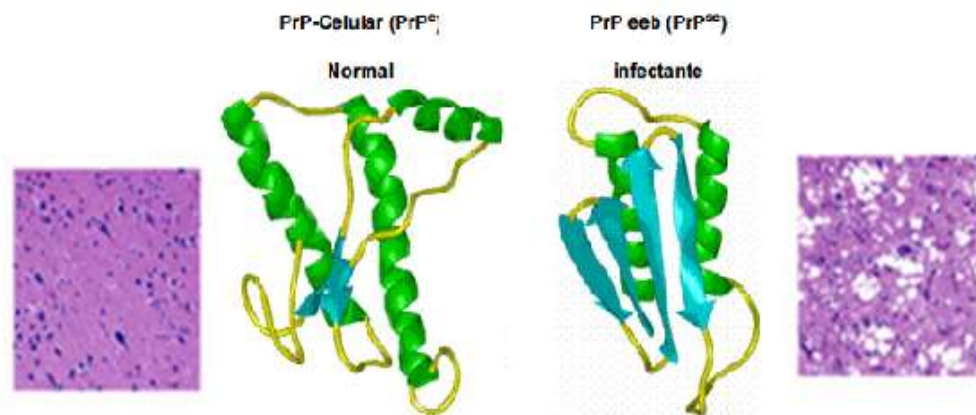


Figura 2. Estructura tridimensional e histológica de una proteína prionica.
Adaptado de Sotelo, 2010.

La PrPc bajo el tratamiento con proteinasa K se destruye por completo, mientras que la PrPsc resiste y reduce su tamaño original a 27-30 kDa, produciendo además una acumulación intracelular en forma de fibras en el sistema nervioso, lo que ocasiona la degeneración neuronal. El plegamiento erróneo le confiere resistencia a la digestión con proteasas e inactivación por nucleasas, además de resistencia a iones metálicos quelatos, radiación UV, formalina, ácidos, altas temperaturas y presiones (Farías, Garcés, Larenas, Ramírez y Lecocq, 2011, pp.1-10).

La PrPc se encuentra en mayor cantidad en el hipocampo, seguido por el corazón, los músculos esqueléticos y con un menor porcentaje en los órganos restantes del hospedero. El tiempo de incubación de la afección depende de la concentración inicial de PrPc que se encuentre en el organismo, además del medio de transmisión por el cual se originó la enfermedad. En cuanto a la vía oral se relaciona con el recorrido de los plexos mesentéricos hasta llegar al sistema nervio central (Prusiner, 1994, pp. 385-395).

La PrPsc se empieza a acumular dentro de las células formando pequeñas cavidades (vacuolas) en las células nerviosas lo que le da un aspecto de esponja, siendo esta característica la más sobresaliente y de donde proviene el

nombre de la enfermedad espongiiforme como se aprecia en la Figura 3 (OIE, 2013, pp.1-6).

La PrPsc no solo afecta al sistema nervioso, sino que además interfiere en el sistema inmune ocasionando daños en la señalización bioquímica de la activación de linfocitos T bovinos. Los priones se transmiten de una especie a otra con una eficiencia menor que dentro de la misma especie, esto se debe a que los priones no pasan fácilmente de una especie a otra, que tenga una mínima diferencia de la secuencia de aminoácidos (Pinto et al., 2015, pp. 50-57).

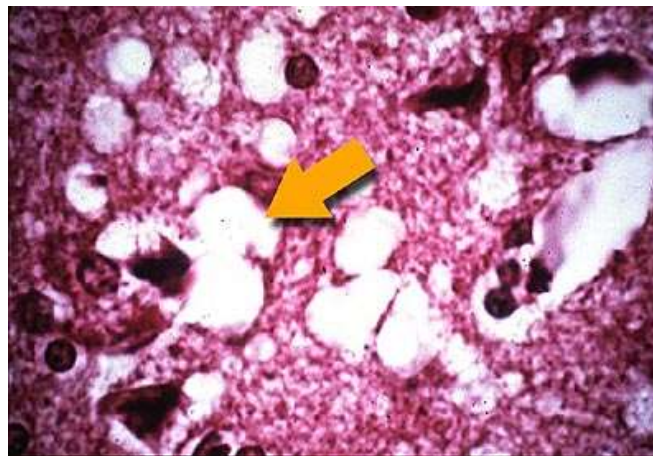


Figura 3. Histopatología del cerebro bovino infectado con EEB.
Tomado de Torres et al., s.f.

2.1.1.2. Transmisión

Los priones presentes en los piensos se transmiten por vía oral, a través del sistema digestivo son transportados al torrente sanguíneo hasta llegar al sistema linfático, donde la proteína prionica patógena es fagocitada siendo este un mecanismo para que las PrPsc sean transportadas al bazo y nódulos linfáticos, los cuales son bastante inervados para generar la primera replicación periférica de los PrPsc y posteriormente alojarse en los nervios periféricos del SNC. Otra forma de contagio es mediante injertos, trasplantes y tratamientos hormonales (Farías, Garcés, Larenas, Ramírez y Lecocq, 2011, pp.1-10).

2.1.1.3. Prevalencia e incidencia

La EEB fue diagnosticada por primera vez en Reino Unido en 1986, y se ha extendido por Asia, Europa, Oriente Medio (Israel) y Norteamérica. Desde el año de 1986 se ha extendido en otros países del mundo como: Portugal, Suiza, Francia, Bélgica, Luxemburgo, Dinamarca, Alemania, España, Italia, Japón, Estados Unidos, Canadá. Siendo el último caso reportado en el año 2012 el de Brasil tal como se observa en la Figura 4 (OIE, 2016, pp.1-6).

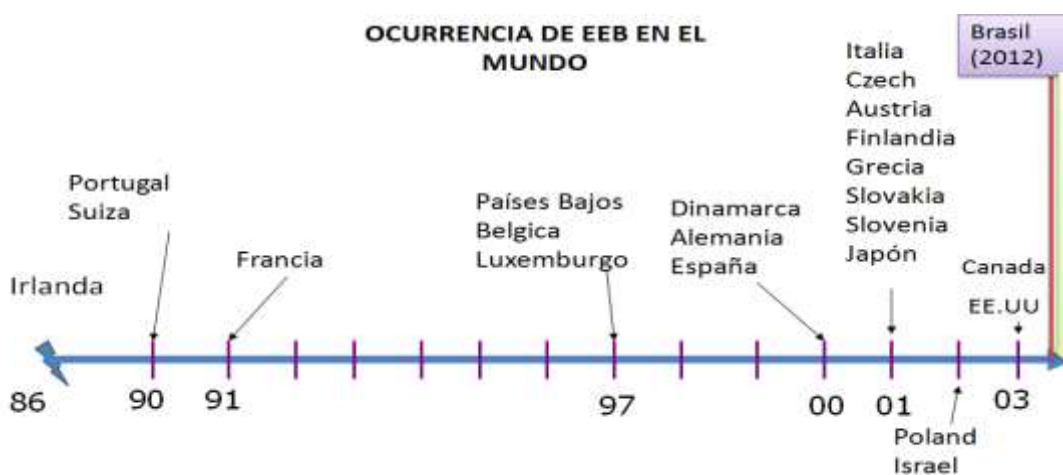


Figura 4. Incidencia de Encefalopatía espongiforme bovina en el mundo.

Tomado de AGROCALIDAD, 2016.

Reino Unido ha diagnosticado 106 casos de (ECJ), Francia dos y en Irlanda uno. La distribución geográfica de los países que notificaron al menos un caso confirmado de EEB desde 1989 se puede observar en la Figura 5, la cual está evaluada por la OIE (Delgado, Rangel y León, 2002, pp. 69-75.).



Figura 5. Países que notificaron al menos un caso de EEB desde 1989. Tomado de OIE, 2016.

2.1.1.4. Signos clínicos

La EEB se presenta en animales adultos de ambos sexos y principalmente en los ganados lecheros (Corona et al., 2007, pp.312-317). Los síntomas se empiezan hacer visibles a partir del cuarto año de edad en donde se evidencia descoordinación del paso, hiperestesia y una aprehensión progresiva, con un tiempo de duración de 2 a 6 meses hasta la muerte del animal (Brun et al., 2004, pp.75-83). El cuadro clínico es nerviosismo, miedo, agresividad, rechinar de dientes, posición anormal de las orejas, cambio temperamental, mayor sensibilidad a los ruidos y a la luz, lamido excesivo, presión de la cabeza contra objetos, ceguera, poca coordinación en la marcha lo que genera una parálisis posterior y caída de los animales (Deborah, 2004, pp.1-5).

2.1.1.5. Diagnóstico de la enfermedad

La EEB es una afección que se puede diagnosticar por medio de los síntomas clínicos, histopatología, así como la detección de priones por medio: Western Blots y ELISA, los cuales se llevan a cabo por medio del estudio del cerebro

específicamente del Obex, en donde se aloja la mayor cantidad de priones patógenos (Delgado, Rangel y León, 2002, pp. 69-75.). Para la realización de los métodos de diagnóstico es necesario el sacrificio del animal o a su vez el esperar hasta su muerte para posteriormente hacer el examen empleando cualquiera de las técnicas antes mencionadas (OIE, 2016, pp.1-6).

2.1.1.5.1. Histopatología

El diagnóstico de EEB se basa en el estudio histopatológico de una muestra del sistema nervioso central fijada con formol por medio de microscopía óptica, en la cual se puede apreciar alteraciones espongiiformes. Se requiere una parte del Obex (Figura 6), la cual corresponde a la primera porción de la médula cervical, en donde se deben apreciar lesiones como vacuolización de los cuerpos y las prolongaciones neuronales, necrosis neuronal y astrogliosis para un resultado positivo (Figura 7). Cabe mencionar que este estudio es poco sensible y para llevarlo a cabo se requiere del estudio pos mortem del animal, además de pruebas confirmatorias como Elisa y Western Blot, las mismas que detectan la presencia de priones en el tejido nervioso (ICA, 2016, pp.1). La patología del scrapie muestra poca o nula vacuolización en el Obex por lo tanto esta técnica resulta ser ineficiente para como prueba de diagnóstico de esta enfermedad (Pinto et al., 2015, pp. 50-57).



Figura 6. Tallo encefálico (Obex).

Tomado de Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 2016.

Diagnostico negativo:
Ausencia de vacualización

Diagnostico positivo:
Vacualización en núcleos

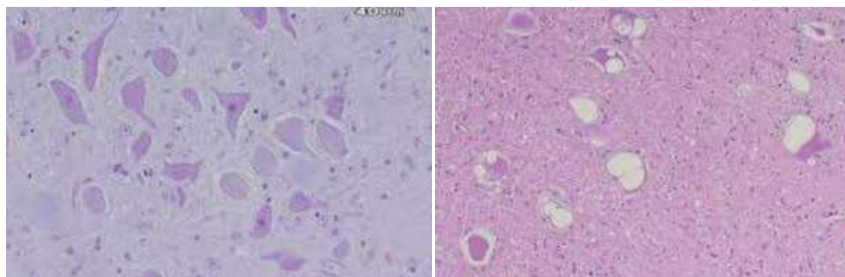


Figura 7. Histopatología del cerebro bovino.

Tomado de Torres et al., s.f.

2.1.1.5.2. Western Blot (WB)

Esta es una prueba que presenta una especificidad cercana al 100%, pero la sensibilidad no es suficiente para conformar un resultado negativo, debido a que se desconoce la cantidad de material infectivo en lo que corresponde a fases premortem (Prusiner, 1982, pp.136-144). El diagnóstico consiste en la detección de PrPsc en donde se requiere la presencia de bandas de masa molecular de 27-30 kDa en muestras que han sido tratadas con proteinasa K (Figura 8 y Figura 9), las mismas que son comparadas con controles. (Pinto et al., 2015, pp. 50-57).

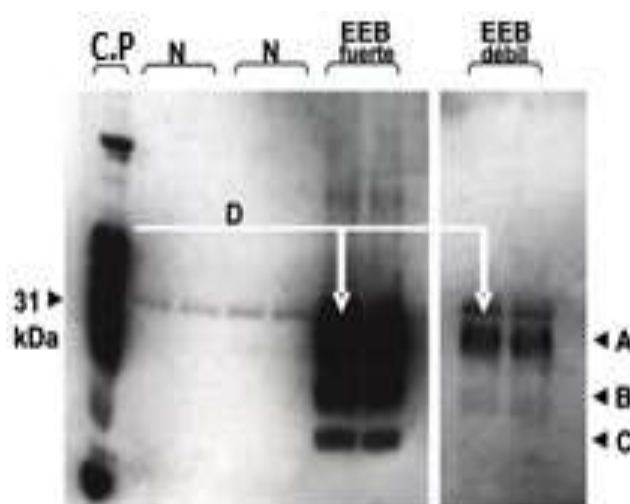


Figura 8. Interpretación de resultados por medio de Western blot.

Tomado de Agrocalidad, 2017.

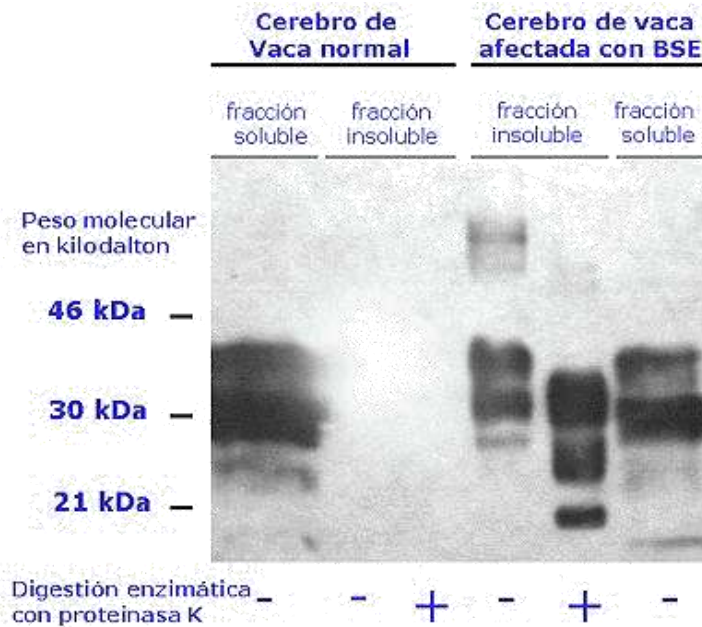


Figura 9. Comparación entre un animal sano y un infectado por medio de la técnica de Western blot.

Tomado de Torres et al., s.f.

2.1.1.5.3. ELISA

Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos anti PrP y la propiedad de resistencia a la digestión con proteasas de los priones patógenos PrP^{Sc}. Para la detección de la proteína patógena la muestra debe someterse a un proceso de digestión enzimática, siendo la PrP^{Sc}, la proteína resistente a la proteinasa K, la que es detectada por los anticuerpos específicos conjugados con la enzima (Figura 10), la muestra positiva es detectada por medio de una reacción en la luminiscente que es cuantificada para dar un resultado positivo, negativo o indeterminado dependiendo de la muestra que haya sido analizada y de la cantidad de priones que han infectado la muestra (Prusiner, 1982, pp.136-144).

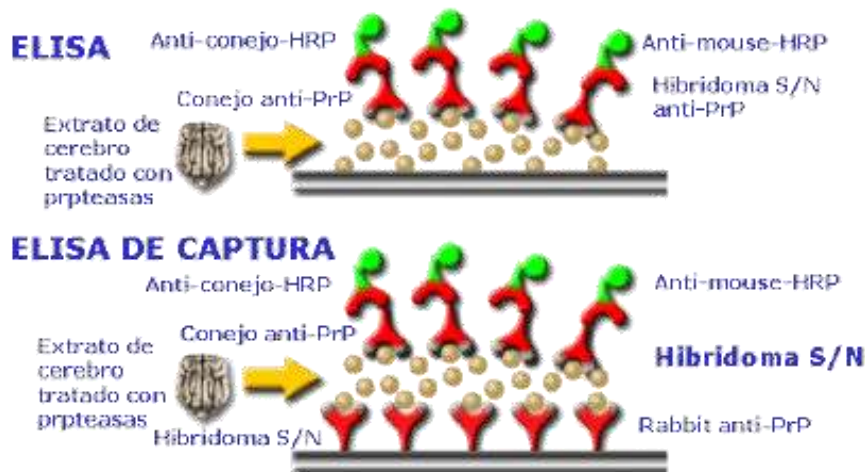


Figura 10. Técnica de ELISA para la detección de priones patógenos.

Tomado de Torres et al., s.f.

2.1.1.6. Riesgos para la salud pública

La EEB es una enfermedad que genera zoonosis, es decir que puede ser transferida de animales al hombre. Esta afección produce un cuadro neurodegenerativo, esponjiforme, progresivo y fatal en los seres humanos y por lo general son más susceptibles los individuos de más de 65 años (Deborah, 2004, pp.1-5).

La enfermedad ECJv en los humanos podría ser generada por el consumo de productos de bovinos infectados, por lo que en varios países han implementado como medida preventiva la eliminación de todo el tejido nervioso durante el procesamiento y también la eliminación de todo animal posiblemente sospechoso. Adicionalmente, se debe manipular con mucha precaución todo el tejido nervioso y linfáticos de los animales sospechosos de EEB, procedentes de laboratorios o mataderos con la finalidad de evitar una contaminación accidental ya sea ocular u oronasal. Cabe mencionar que la leche y productos lácteos son totalmente inocuos para esta afección (OIE, 2016, pp.1-6).

2.2. Alimentación del ganado bovino

La alimentación del ganado bovino depende principalmente de las necesidades del animal (edad, tasa de crecimiento, edad reproductiva y si se encuentra en periodo de lactancia), además de la orientación productiva del ganado (bovino de carne y bovino de leche). La alimentación consiste principalmente en forrajes ecológicos, piensos compuestos y en menor cantidad harinas y granos enteros como se puede observar en la Tabla 1. Los forrajes ecológicos están compuestos por forrajes verdes, el heno, el ensilado y la paja, Los piensos compuestos contienen cereales, oleaginosas, leguminosas, además se debe suministrar una combinación de sodio y calcio (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación de Colombia, s.f.).

De acuerdo al destino del ganado existe una mayor o menor necesidad de nutrientes, por ejemplo: el bovino de leche necesita mayor cantidad de proteína, por lo cual requiere mayor consumo de piensos compuestos en su alimentación para complementar la nutrición básica que corresponde al forraje permitiendo de esta manera un adecuado desarrollo del animal (Boschini, 2000, pp.1).

Tabla 1.

Alimentos para ganado bovino según su orientación

Alimento	Bovino de carne	Bovino de leche
Forraje	40,00%	7,10%
Forraje y piensos	45,20%	46,50%
Forraje y granos	6,70%	25,00%
Forraje y harinas	5,20%	14,30%
Mezcla de 3 productos	2,20%	7,10%
Alimentos en conversión	0,70%	0,00%
Total	100,00%	100,00%

Tomado de Ministerio de agricultura, pesca y alimentación de Colombia, s.f.

2.2.1. Definición de pienso (alimento para animales)

“Cualquier sustancia o producto, incluido los aditivos, destinado a la alimentación por vía oral de los animales, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente como si no. El pienso puede ser de concentrados (granos) o forrajes duros (heno, ensilaje, forraje) incluidos los balanceados” (Agrocalidad, 2016, p.1).

2.2.2. Ingredientes de los piensos

Los cereales como cebada y maíz son los principales ingredientes de los piensos los cuales forman parte de más del 41% y en menor porcentaje el trigo con aproximadamente el 20,8%. En cuanto a las leguminosas son generalmente las habas y fréjoles, y en las oleaginosas, principalmente la soja, cabe mencionar que todos los ingredientes deben ser inocuos para evitar riesgos en la salud de los animales (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación de Colombia, s.f.).

Los piensos contienen promotores de crecimiento, sintéticos o naturales, que son empleados con el fin de acelerar la transformación de los alimentos y así generar un mayor incremento de peso y tamaño. Existen otros aditivos que ayudan en el crecimiento de los animales como promotores alternativos, los cuales pueden ser: enzimas, micro minerales, vitaminas, oligosacáridos, extractos de aceites que no generan daños en la salud del animal (Cancho, García, y Gándara, 2000, pp.1-2).

2.2.3. Composición nutricional de los piensos

Los piensos tienen compuestos nutricionales de acuerdo a las necesidades del animal, según la edad, la tasa de crecimiento, edad reproductiva y si se encuentra o no en periodo de lactancia, con el fin de suplir todos sus requerimientos nutricionales. Los rumiantes necesitan una alimentación balanceada con las cantidades adecuadas de proteína, energía, vitaminas macro y micro minerales tal como se puede visualizar en la Tabla 2 (Basarab et al., 2003, pp.1-2).

Tabla 2.

Composición nutricional de las materias primas de los piensos

Materias primas	%	Energía (uf/kg)	Proteína (%pd)	Energía (uf/kg)	Proteína (%pd)
Cebada	47	1,01	8,1	0,47	38
Harinillas de trigo	26	0,94	12,1	0,24	31
Harinillas de girasol	10	0,70	27,6	0,07	28
Granos	5	1,02	18,9	0,05	9
Cascarilla de soja	4	0,89	7,9	0,03	3
Urea	1	0	228	0	23
Total				0,86	132

Tomado de Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas, s. f.

2.2.4. Normativa para elaboración de piensos destinados a la alimentación del ganado bovino

La evaluación de los peligros microbiológicos y químicos de los piensos debe ser realizada constantemente, con el fin de evitar el ingreso de peligros alimentarios. La producción, elaboración, almacenamiento, transporte y distribución de los piensos e ingredientes los piensos deben cumplir todos los requisitos reglamentarios aplicables, para lo cual los operadores deberán aplicar las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y también los principios de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) para evitar y controlar los peligros que puedan afectar a la inocuidad de los piensos.

AGROCALIDAD ha dispuesto como medida de prevención de acuerdo a la Resolución 088 actualizada el 12 de septiembre del 2016, “prohibir en todo el territorio nacional la utilización de harinas nacionales o importadas de carne, sangre y huesos de rumiantes para la alimentación de rumiantes o de alimentos para rumiantes que contengan estos productos. Se prohíbe la importación y comercialización de harinas de carne, huesos y sangre de rumiantes para alimentación de rumiantes o alimentos que contengan estos productos desde países afectados por la presencia de la EEB y el Prurigo Lumbar Ovino” (Agrocalidad, 2016, pp.1).

2.3. Vigilancia de la EEB

2.3.1. Medidas de prevención de la EEB

Existen algunas estrategias para prevenir la EEB, entre las cuales se encuentran: las pruebas tamices en la faena del material de riesgo (tejido cerebral o espinal) durante el sacrificio o procesamiento de los animales en los camales, prohibición de inserción de restos bovinos en los piensos destinados a la alimentación del ganado, transparencia en la notificación de los casos diagnosticados con EEB, vigilancia de los casos que presenten enfermedades neurológicas, controles de seguridad para la importación de especies rumiantes conforme al Código Terrestre de la OIE, sacrificio en condiciones de asepsia de los animales sospechosos y posiblemente expuestos a piensos contaminados e identificación del rebaño para rastrear a posibles animales sospechosos (OIE, 2017, pp.1-6).

2.3.2. Estatus de riesgo de EEB

La OIE ha definido un procedimiento específico con fundamento científico e imparcial, para el reconocimiento de estatus sanitario de los países y territorios respecto a la EEB. El capítulo de la OIE sobre la EEB describe actualmente un estatus sanitario que comprende las siguientes categorías: riesgo insignificante, riesgo controlado y riesgo indeterminado como se puede observar en la Figura 11 y 12 (OIE, 2017, pp.1-6).

Ecuador, de acuerdo con la última actualización de mayo del 2016, respecto a la lista de países con riesgo controlado e insignificante de la OIE no forma parte de ninguna de las categorías de la EEB tal como se puede observar en la Tabla 3 y 4 respectivamente (OIE, 2017, pp.1-6).



Figura 11. Mapa del estatus oficial del riesgo de la EEB de los países Miembros de la OIE.

Tomado de OIE, 2017.



Figura 12. Mapa de estatus oficial del riesgo de la EEB de los países miembros de la OIE respecto a Centroamérica.

Tomado de OIE, 2017

Tabla 3.

Listado de países con riesgo controlado de EEB

Países con riesgo controlado de EEB		
Canadá	Grecia	Nicaragua
Francia	Irlanda	Taipéi Chino

Tomado de OIE, 2017.

Tabla 4.

Listado de países con riesgo insignificante de EEB

Países con riesgo insignificante de EEB		
Alemania	Eslovenia	México
Argentina	España	Namibia
Australia	Estados Unidos de América	Noruega
Austria	Estonia	Nueva Zelanda
Bélgica	Finlandia	Países Bajos
Brasil	Hungría	Panamá
Bulgaria	India	Paraguay
Checa (Rep.)	Islandia	Perú
Chile	Israel	Polonia
Chipe	Italia	Portugal
Colombia	Japón	Rumania
Corea (Rep. de)	Letonia	Singapur
Costa Rica	Liechtenstein	Suecia
Croacia	Lituania	Suiza
Dinamarca	Luxemburgo	Uruguay
Eslovaquia	Malta	

Tomado de OIE, 2017.

2.3.3. Programas de vigilancia de la EEB

La OIE y la OMS han alentado a sus territorios a implementar medidas de prevención de la EEB, con el fin de evitar el ingreso de la enfermedad en sus territorios, e incorporar sistemas de vigilancia y seguimiento, todo esto con el propósito obtener una categorización dentro de la OIE como países con riesgo controlado, indeterminado e insignificante para EEB (OIE, 2017, pp.1-6).

2.3.4. Vigilancia activa y pasiva de la EEB en el Ecuador

En Ecuador se realizan programas de vigilancia de forma activa y pasiva con el propósito de mantener al país libre de EEB. La vigilancia pasiva en bovinos se realiza cuando hay presencia de signos clínicos neurológicos que no ceden a ningún tratamiento y aquí se relaciona el número de muestras con el número de casos notificados. La vigilancia activa se realiza en mataderos, donde se llevan a cabo sacrificios de rutina durante todo el año (AGROCALIDAD, 2017).

Ecuador lleva un programa de vigilancia por medio de la técnica de WB, con un total de 2650 muestras distribuidas de las siguientes formas: en el año 2014 se realizaron 207, 2015 fueron 1224, 2016 fueron 646 y en el 2017 se llevaron a cabo 573 muestras en las diferentes provincias del Ecuador, de los cuales ninguno de los casos ha sido reportado como positivo (AGROCALIDAD, 2017).

2.3.5. Detección de ADN mitocondrial de bovino en piensos destinados para la alimentación del ganado

Dentro de la vigilancia de la EEB se pretende realizar la detección de restos bovinos en piensos destinados a la alimentación del ganado, para evitar futuros brotes de la enfermedad (Pinto et al., 2015, pp. 50-57). La detección de ADN mitocondrial bovino en piensos requiere de un método óptimo de extracción de ADN mitocondrial. En literatura se ha reportado un método tradicional, el cual se basa en las propiedades de unión del ADN a partículas de sílice en presencia de GuSCN, sin embargo, también se emplean métodos de extracción comercial que permiten obtener un ADN de mejor calidad y más estable (Boom et al., 1990, pp. 495-503).

Según varias fuentes bibliográficas la identificación del ADN mitocondrial se puede conseguir gracias a la técnica de la PCR, para lo cual han sintetizado cebadores específicos de la especie bovina que amplifican una región altamente conservada del ADN mitocondrial, además se han realizado pruebas para

determinar el límite de detección y especificidad analíticas con el fin de obtener ensayos de PCR específicos y con un alta sensibilidad para la detección de material derivado de restos bovinos, obteniendo de esta manera una herramienta eficaz para el control de la transmisión de la enfermedad (Corona et al., 2007, pp.312-317).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

La presente investigación, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD), ubicado en el sector de Tumbaco, Avenida Interoceánica km. 14 1/2 y Gonzales Suárez, bajo la dirección científica de M.Sc. Ana Garrido Haro responsable técnico del laboratorio de Biología Molecular.

El diagrama del diseño experimental de la presente investigación se puede visualizar en la Figura 13, en donde se empleó un diseño de tipo exploratorio, el cual se enfocó en determinar el mejor método de extracción de ADN mitocondrial en alimentos balanceados y la optimización de la PCR para la detección de una región altamente conservada del genoma mitocondrial bovino. Para la optimización se evaluaron parámetros como la temperatura de alineamiento, concentración de cebadores y concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Además, se midió el límite de detección (sensibilidad) y la especificidad analítica de la PCR optimizada. Finalmente se llevó a cabo un análisis cualitativo por medio de una electroforesis para determinar si los piensos contienen restos de animales bovinos. Cabe mencionar que se empleó una extracción de ADN mitocondrial de harina de hueso fresco bovino o sangre de bovino como control positivo y agua DEPC (Dietilpirocarbonato) como control negativo en la PCR.

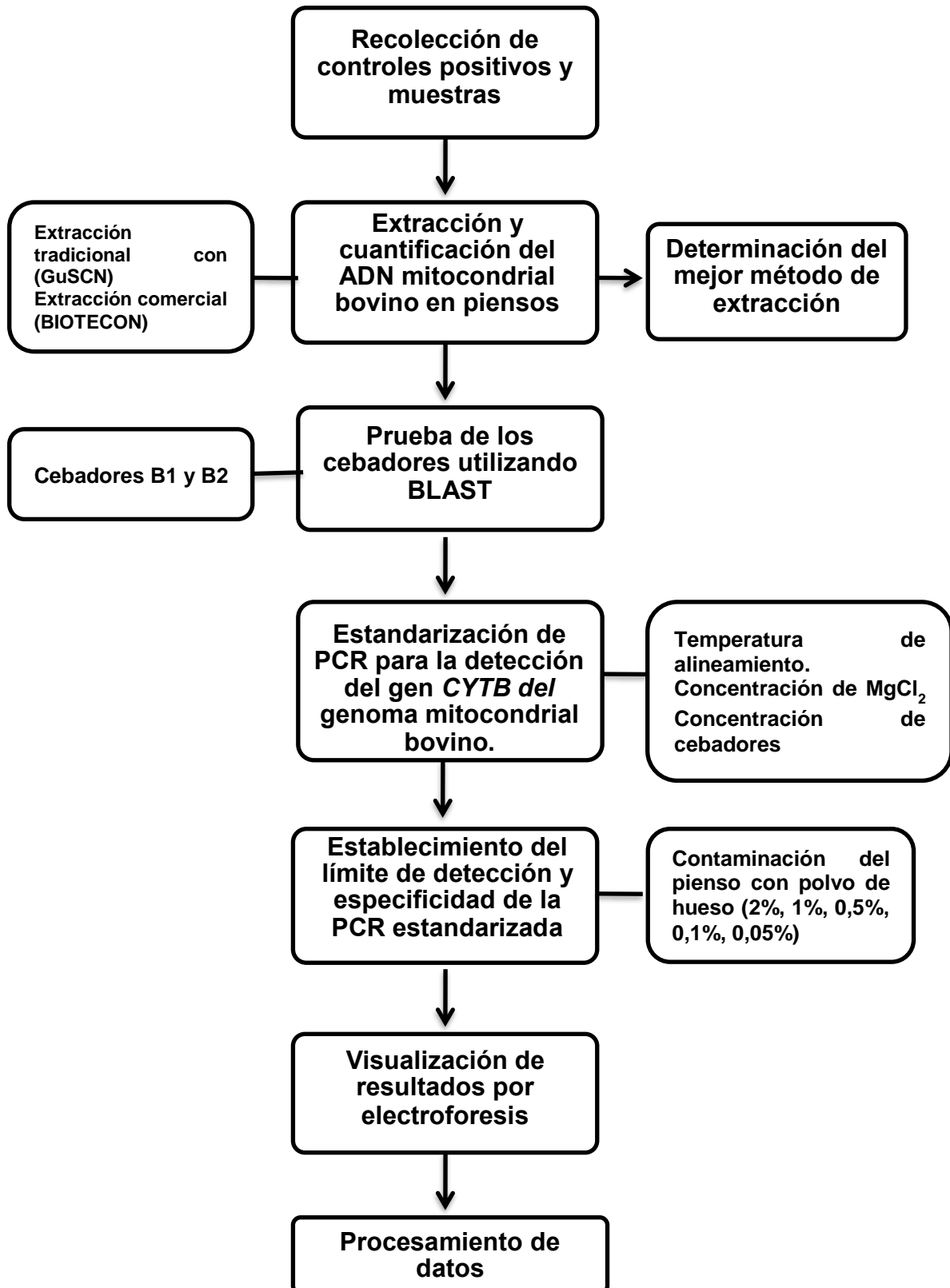


Figura 13. Diseño del plan experimental para la detección de restos bovinos en piensos por medio de PCR

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Población y muestra

Se recolectaron seis muestras de piensos provenientes de las provincias de Azuay, Chimborazo, Guayas, Pichincha y Tungurahua, las cuales fueron transportadas en bolsas plásticas a temperatura ambiente hasta el Laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD, en donde se procesaron para determinar si estos alimentos balanceados han sido o no elaborados con residuos bovinos.

4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos

4.2.1. Elaboración de Controles positivos

4.2.1.1. Controles positivos de harina de hueso fresco bovino

La obtención de controles positivos de ADN mitocondrial a partir de harina de hueso bovino para la optimización de la PCR, requirió de la elaboración de harina de hueso bovino, la cual consistió en macerar el tejido óseo de acuerdo al protocolo sugerido por Kalmar et al., (2000, pp. e67). Se eliminó toda la superficie del fragmento óseo (músculo, cartílago) con la ayuda de una lija estéril.

El hueso se sumergió en dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% por unos segundos y luego se lavó con abundante agua estéril hasta eliminar todo el SDS. Posteriormente se sumergió el hueso en alcohol durante 2min y se lavó con agua estéril hasta eliminar todo posible residuo de alcohol. Por último, se sumergió el hueso en hipoclorito de sodio al 2% durante 5min y se lavó con abundante agua estéril. Finalmente, el hueso se dejó secar a temperatura ambiente por 24h, para después cortarlo en fragmentos pequeños con la ayuda de una cierra estéril. Los fragmentos óseos fueron colocados en un criomil hasta pulverizarlos por completo y obtener la harina de hueso fresco bovino y la cual colocó en tubos de

2 mL para la posterior extracción de ADN mitocondrial empleando el protocolo detallado más adelante.

4.2.1.2. Controles positivos de sangre de bovino

Para la obtención de los controles positivos se requirió una alícuota de sangre de bovino, para la posterior extracción del ADN mediante un juego de extracción comercial por columna de HighPure Viral Nucleic Acid Kit, catálogo No. 11 858 874 001, siguiendo las instrucciones del fabricante en este caso Roche, Alemania.

4.2.2. Contaminación de pienso con harina de hueso fresco molido.

Se realizó la contaminación del pienso con diferentes concentraciones de harina de hueso de bovino (0,2 (C1); 0,1 (C2); 0,05 (C3); 0,01 (C4) y 0,005 (C5)) en 10 gr de pienso molido, los cuales corresponden a los porcentajes del (2,0; 1,0; 0,5; 0,1 y 0.05%) respectivamente.

4.2.3. Métodos de extracción de ADN mitocondrial

4.2.3.1. Metodología según Boom et al., (1990, pp. 495-503).

La metodología de extracción de ADN mitocondrial en piensos se llevó a cabo según el protocolo de Boom et al., (1990, pp. 495-503), Como primer punto se pesaron 0,5g de pienso contaminado (polvo fino), a los cuales se adicionó 8 mL de buffer de extracción (5M GuSCN; 0,05 M Tris-HCl, pH 6,4; 0,02 M EDTA, pH 8,0; 1,3 % Triton X-100). Se dio un vórtex e incubó a 60°C por 15 a 20h con movimiento en un termobloque (Thermomixer Comfort, Eppendorf®, EEUU). Después de transcurrido este tiempo se centrifugó a 3200 rpm por 10 min y se tomó 500 µL del sobrenadante al cual se le adicionó una mezcla de 500 µL del buffer de extracción con 40 µL de la suspensión de dióxido de silicio (SiO₂), el cual se colocó en el termobloque (Thermomixer Comfort, Eppendorf®, EEUU)

durante 10 min a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo se procedió a centrifugar a 10000 rpm durante 3 min y se removió cuidadosamente el sobrenadante por pipeteo.

El pellet de silica que se obtuvo se lavó posteriormente tres veces con 500 μ L de buffer de lavado (5M GuSCN; 0,05 M Tris-HCl, pH 6,4), dos veces con etanol al 70% y uno con acetona. Por cada lavado se dio un vórtex y una centrifugación a 10000 rpm, durante 3 min. Una vez terminados todos los lavados se procedió a secar el pellet, durante 15 min a temperatura ambiente (pellet color blanco brillante), se eluyó el ADN total en 75 μ L del buffer de elución (Tris, EDTA pH 8,0) se dio un vórtex e incubó a 56°C durante 10 min luego se centrifugó a 12000 rpm, durante 5 min y se pasó 50 μ L a un nuevo tubo. Al pellet que quedo se adicionaron 75 μ L del buffer de elución (Tris, EDTA pH 8,0) e incubó a 56°C durante 10 min, luego se centrifugó 12000 rpm durante 5 min y se tomaron 50 μ L los cuales fueron unidos con los 50 μ L anteriores, quedando un volumen final de 100 μ L que fueron almacenados -20°C.

4.2.3.2. Extracción de ADN mitocondrial bovino mediante un juego comercial de extracción

La metodología de extracción de ADN mitocondrial en piensos se llevó a cabo mediante un juego comercial de extracción por columna BIOTECON *Diagnostics-foodproof®Sample Preparation Kit III*. Versión 1 (Roche, Alemania).

Para el aislamiento de ADN se emplearon 200 mg de muestra de alimento homogeneizado. Se procedió con el siguiente protocolo.

1. Se maceró la muestra con la ayuda de un mortero y pistilo, hasta obtener un polvo fino y homogéneo.
2. Se pesaron 200 mg de muestra.
3. Se añadió 1 mL del tampón de extracción a la muestra homogeneizada en tubos de microcentrífuga de 2 mL.
4. Se dio un vórtex durante 30 s.

5. Se añadieron 80 μL de Proteinasa K a la solución de trabajo.
6. Se incubó a 72°C por 30 min y se mezcló 2-3 veces durante la incubación
7. Se centrifugó durante 10 min a 12000 xg.
8. Se añadieron 400 μL de binding buffer y 200 μL de isopropanol a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL.
9. Se transfirió el sobrenadante al nuevo tubo de microcentrífuga de 2 mL y luego se mezcló suavemente por pipeteo.
10. Se dispensaron 650 μL de la mezcla en el depósito superior de la columna de extracción previamente inmersa en un tubo colector.
11. Se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) durante 1 min a 5000 xg.
12. Se descartó el tubo colector y se colocó la columna de extracción en un nuevo tubo colector.
13. Se dispensó la mezcla restante en la misma columna con el nuevo tubo colector.
14. Se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) durante 1 min a 5000 xg.
15. Se desechó el tubo colector y se colocó la columna en nuevo tubo colector.
16. Se añadieron 450 μL el tampón de lavado al depósito superior.
17. Se centrifugó en una microcentrífuga durante 1 min a 5000 xg.
18. Se desechó el flujo y se volvió a usar el tubo colector.
19. Se repitió el lavado con 450 μL del tampón de lavado.
20. Se centrifugó en una microcentrífuga (Eppendorf, Alemania) durante 1 min a 5000 xg.
21. Se desechó el flujo y se volvió a usar el tubo colector.
22. Se centrifugó durante 10 s a máxima velocidad (13000 xg), para eliminar el tampón de lavado residual.
23. Se insertó la columna en un tubo limpio de 1,5 ml.
24. Se añadieron 80 μL del tampón de elución previamente calentado a 70°C sobre la columna de extracción.
25. Se incubó a $15 - 25^{\circ}\text{C}$ por 5 min.

26. Se centrifugó durante 1 min a 5000 xg.
27. Se repitió los pasos 24, 25 y 26 hasta obtener un volumen final de 160 μL .
28. Se conservó el ADN eluido a -20 o -40°C

4.2.4. Cuantificación de ADN mitocondrial por espectrofotometría

Se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nanodrop 8000 (*Thermo Fisher Scientific*; EEUU) la cantidad ADN mitocondrial bovino extraído por los dos métodos antes mencionados y además se evaluó su pureza. Cabe mencionar que en ambos métodos se midió a una absorbancia de 260/280.

El protocolo empleado fue el sugerido por el fabricante, en donde se agregó 3 μL de agua DEPC en cada uno de los sensores del espectrofotómetro para limpiar el equipo. Posteriormente se agregaron 2 μL de los tapones de elución de cada uno de los métodos de extracción con el objetivo de blanquear el equipo y finalmente se limpió cada uno de los sensores y se agregó 2 μL de la muestra para proceder a la cuantificación. Al finalizar todo el proceso se limpió los sensores y se guardó las muestras en -80°C para su conservación.

4.2.5. Cebadores

La secuencia de los cebadores empleados en la optimización de la PCR se detalla en la Tabla 5, los mismos que fueron definidos por Corona et al., (2007, pp.312-317). Los cebadores B1 y B2 amplifican una región conservada del genoma mitocondrial bovino con un tamaño del amplicon de 165 pares de bases (pb) y mediante PCR *in situ* se pudo verificar la posición del fragmento, el cual inicia en 14998 pb y termina en 15165 pb, región de amplificación el gen *CYTB* citocromo b.

Tabla 5.

Cebadores para la amplificación de ADN mitocondrial bovino

Patógeno	Cebador	Secuencia cebadores	Tamaño pb
Bovino	B1	5'CATCATAGCAATTGCCATAGTCC3'	165
	B2	5'GTACTAGTAGTATTAGAGCTAGAATTAG3'	

Adaptado de Corona et al., 2007.

4.2.6. Protocolo de PCR convencional optimizado para la detección de una región conservada del genoma mitocondrial bovino

Para la amplificación de una región conservada del ADN mitocondrial bovino del gen *CYTB*, se empleó un ensayo adaptado del protocolo de Corona et al., (2007, pp.312-317) a los recursos con los cuales cuenta el Laboratorio de Biología Molecular de ACROCALIDAD. Los reactivos utilizados fueron: tampón de PCR green Flexi (Promega, EEUU), MgCl₂ (Promega, EEUU), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) (Promega, EEUU), Enzima GoTaq Hot Start (Promega, EEUU) y cebadores B1 y B2 (Macrogen, EEUU). En la Tabla 6 y 7 se puede visualizar las condiciones para la PCR según Corona et al., (2007, pp.312-317).

Para la optimización de las condiciones de la PCR, no se emplearon ensayos por duplicado por la falta de reactivos, pero se estandarizó la técnica para tres muestras diferentes: harina de hueso fresco bovino, sangre de bovino y pienso infectado con harina de hueso bovino, de esa manera se logró corroborar las condiciones óptimas para el ensayo de PCR, el cual amplifica una región conservada del ADN mitocondrial bovino.

Tabla 6.

Volúmenes y concentraciones para la preparación de la mezcla de PCR

Reactivo	Concentración		Vol. X1 (μ l)
	Inicial	Final	
H ₂ O	NA	NA	13,13
Buffer PCR Green Flexi	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTP's	10 mM	0,25 mM	0,625
Cebador B1	25 μ M	15 pmoles	0,5
Cebador B2	25 μ M	15 pmoles	0,5
Enzima Go Taq Hot Start	5 U/ μ l	2,5 U/50 μ l	0,25
Volumen de mezcla			22,5

Adaptado de Corona et al., 2007

Nota. Volumen de la Reacción final 25 μ l = 22,5 μ l PCR mix + 2,5 μ l ADN

NA= No asignado

5X= Significa 1 parte de la solución concentrada y 4 partes de solvente.

1X= Significa agregar una parte de la solución concentrada

Tabla 7.

Perfil térmico de amplificación de una región conservada del genoma mitocondrial bovino

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min: s)
1	95	02:00
	94	01:00
30	58	01:00
	72	01:30
1	72	10:00
1	12	∞^*

Adaptado de Corona et al., 2007

Nota. ∞^* = Infinito

4.2.6.1. Optimización de la temperatura de alineamiento

El ensayo de optimización de T_a (temperatura de alineamiento o temperatura de hibridación) consistió en la elaboración de un gradiente de temperaturas a partir de un promedio de T_a , la cual se calcula a partir de T_m (Temperatura de melting) de cada uno de los cebadores.

El rango de amplificación para el gradiente de temperatura fue de 62 a 57°C, el cual se puede visualizar en la Tabla 8. Además, se realizaron tres ensayos que corresponden a las muestras de: harina de hueso fresco bovino, sangre de bovino y pienso infectado con harina de hueso bovino, con la finalidad de establecer una temperatura en común para las tres muestras antes mencionadas.

Tabla 8.

Gradiente de amplificación de la temperatura de alineamiento

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
1	95	02:00
	94	01:00
30	Grad*	01:00
	72	01:30
1	72	10:00
1	12	∞

Nota. Grad*= Gradiente de temperatura (62,0; 61,6; 61,0; 60,1; 58,9; 58,0; 57,3; 57,0°C).

4.2.6.2. Optimización de la concentración de cebadores

El ensayo de optimización de la concentración de cebadores para la detección de una región conservada de ADN mitocondrial bovino consistió en un gradiente de la concentración de cebadores de 0,2 μM a 0,8 μM , con un incremento consecutivo de 0,1 μM . El volumen final de la reacción de 45 μL y se completó con agua DEPC para cada una de las concentraciones del gradiente de cebadores, el mismo que se puede observar en las Tabla 9 y 10.

Se realizaron tres ensayos que corresponden a las tres muestras que se mencionaron anteriormente con el fin de estandarizar la técnica para varias muestras y encontrar un protocolo en común.

Tabla 9.

Concentración de reactivos para la mezcla de PCR

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Vol. X1 (μ l)
H ₂ O	NA	Grad	-
<i>Buffer PCR Green Flexi</i>	5 X	1 X	10
MgCl ₂	25 mM	2,5 Mm	5
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1
Cebador B1	25 μ M	Grad*	-
Cebador B2	25 μ M	Grad*	.
Enzima <i>Go Taq Hot Start</i>	5 U/ μ l	1,25 U/50 μ l	0.25
Volumen de mezcla			45

Nota. Volumen de la Reacción final 50 μ l = 45 μ l PCR mix + 5 μ l ADN

Grad= Variación del volumen de agua de PCR con respecto a la concentración de cebadores (Tabla 10).

Grad*= Gradiente de concentración de cebadores: 0,2 μ M-0,8 μ M (Tabla 10).

NA= No asignado

Tabla 10.

Volúmenes para el gradiente de concentración de cebadores

Reactivo	0,2 μ M	0,3 μ M	0,4 μ M	0,5 μ M	0,6 μ M	0,7 μ M	0,8 μ M
H ₂ O	27,95	27,55	27,15	26,75	26,35	25,95	25,55
Cebador B1	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6
Cebador B2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6

4.2.6.3. Optimización de la concentración de MgCl₂

El ensayo de optimización de la concentración de MgCl₂ consistió en un gradiente de la concentración final entre 1 mM a 3 mM con incrementos consecutivos de 0,5 mM, como se indica en la Tabla 11 y 12. Además se realizaron tres ensayos que refieren a las tres muestras antes mencionadas.

Tabla 11.

Gradiente de concentración de MgCl₂ para la mezcla de PCR

Reactivo	Concentración Inicial	Concentración Final	Vol. X1 (µl)
H ₂ O	NA	Grad	-
Buffer PCR Green Flexi	5 X	1 X	10
MgCl ₂	25 mM	Grad*	-
dNTP's	10 mM	0,2 mM	1
Cebador B1	25 µM	0,5 µM	1
Cebador B2	25 µM	0,5 µM	1
Enzima Go Taq Hot Start	5 U/µl	1,25 U/50µl	0.25
Volumen de mezcla			45

Nota. Volumen de la Reacción final 50µl: 45 µl PCR mix + 5 µl ADN

Grad=Variación del volumen de agua de PCR (Tabla 12).

Grad*= Gradiente de concentración de MgCl₂: 1,0 mM - 3,0 mM (Tabla 12)

Tabla 12.

Volúmenes para el gradiente de concentración de MgCl₂

Reactivo	1,0 mM	1,5 mM	2,0 mM	2,5 mM	3,0 mM
H ₂ O	29,75	28,75	27,75	26,75	25,75
MgCl ₂	2	3	4	5	6

4.2.7. Visualización de los productos de PCR por electroforesis

Los productos de amplificación fueron migrados en un gel de agarosa al 2% con una intensidad de corriente de 100 V y un tiempo de 35 min. En cada pocillo se colocó 10 µL del producto de la PCR de cada muestra problema y en un pozo adicional se colocó el marcador de peso molecular de un 1 Kb (Promega, EEUU) para estimar el tamaño del amplicon.

4.2.8. Criterios de aceptación o rechazo de los resultados

Los resultados de la amplificación de la PCR de las muestras analizadas se reportaron cualitativamente, ante la ausencia o presencia de una banda de tamaño 165 pb en el gel de agarosa. Para la validación de los resultados se

observó que el control negativo no presentó ninguna banda y que el control positivo dio lugar a una banda marcada de tamaño esperado de 165 pb para bovino, por lo tanto, para reportar un resultado positivo la muestra problema debe presentar una amplificación caso contrario será un resultado negativo.

4.2.9. Verificación de la integridad de controles positivos

Para evaluar la integridad de los controles positivos se procedió a realizar tres repeticiones de amplificación del ADN mitocondrial bovino con el protocolo optimizado de la PCR antes mencionado. Un ensayo se realizó el primer día de realizada la extracción de ADN mitocondrial bovino, un segundo ensayo a los 30 días y un tercer ensayo a los 60 días, con la finalidad de observar si existe alguna degradación de los controles positivos al transcurrir el tiempo y de esa manera preservar los controles para ensayos futuros. Cabe mencionar que el ensayo se realizó dos veces: uno para controles positivos provenientes de harina de hueso fresco bovino y otro para sangre de bovino.

4.2.10. Determinación de la sensibilidad analítica

4.2.10.1. Límite de detección en piensos infectados con harina de hueso fresco bovino

Para el límite de detección se contaminó al pienso con harina de hueso de bovino en las proporciones de: C1 ($12,90 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), C2 ($6,5 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), C3 ($3,25 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), C4 ($1,62 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), y C5 ($1 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$), para evaluar hasta que nivel de contaminación detecta la PCR. El ensayo se realizó por duplicado con el fin de corroborar el último límite de detección del protocolo previamente estandarizado.

4.2.10.2. Límite de detección por diluciones seriadas

Para evaluar el límite de detección de la PCR optimizada, se realizaron dos ensayos. El primer ensayo consistió en diluciones seriadas de 1:10 a partir del control positivo de ADN mitocondrial bovino, el cual provino de una extracción de harina de hueso fresco bovino. El segundo ensayo consistió en diluciones seriadas de 1:10 a partir de la extracción de una muestra de pienso contaminada con 2% de harina de hueso fresco bovino (Figura 14).

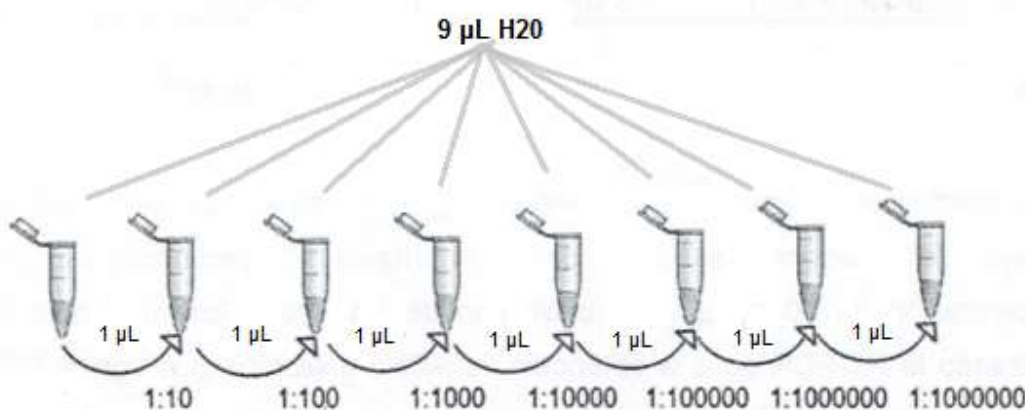


Figura 14. Esquema de las diluciones seriadas.

4.2.11. Determinación de la especificidad

Para la evaluación de la especificidad *in silico* de los cebadores se realizó un análisis en el programa Primer-Blast, para determinar si los cebadores DNAB1 y DNAB2 corresponden a la especie bovina. Además, se realizó un ensayo comparativo de amplificación de las extracciones de ADN mitocondrial bovino, ADN mitocondrial porcino, ADN mitocondrial ovino, una mezcla de ADN mitocondrial bovino más ADN mitocondrial porcino y una mezcla de ADN mitocondrial bovino más ADN mitocondrial ovino, con el objetivo de evaluar si existe alguna amplificación en otra especie que no sea bovina. Cabe mencionar que los ensayos fueron realizados mediante el protocolo optimizado antes mencionado.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción de ADN mitocondrial.

5.1.1. Comparación de dos métodos de extracción por absorbancia y cuantificación

El ADN mitocondrial bovino obtenido por dos métodos de extracción diferentes, se pueden comparar en la Tabla 13, la cual indica valores de absorbancia A280 nm, 260/280, 260/230 y la concentración de ADN medidos en el espectrofotómetro (*Thermo Scientific™ NanoDrop 8000*, EEUU), además se puede visualizar el tiempo de procesamiento que requiere cada método.

El análisis de los parámetros antes mencionados permite seleccionar la mejor metodología de extracción, resultando el método comercial la alternativa más eficiente, debido a que presenta valores de ratio 260/280 de 1,89 en promedio de las extracciones determinando que es un ADN puro, de acuerdo a lo establecido por el fabricante del equipo *NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, 2013, pp.25-30)* en donde se considera un valor próximo a 1.8 aceptado como ADN puro y de 2,0 aceptado como ARN puro, lo cual indica que el método comercial tiene mayor cantidad de ADN que de ARN en comparación con el método tradicional descrito por Boom et al., (1990, pp. 495-503) que presentó una medida de 2,01, lo que determina que presenta una mayor cantidad de ARN que de ADN en la extracción.

Una baja relación en la medida del ratio 260/230 indica contaminación con fenoles, guanidina y glucógeno, por lo tanto el método comercial es considerado como la mejor alternativa debido a que presenta un valor de 1,86, en comparación con el método tradicional que tiene un valor de 0,08 lo cual indica que tiene una alta contaminación con solventes orgánicos (*Thermo Fisher Scientific, 2013, pp.25-30*). La concentración de ADN total de las muestras es un parámetro que determina la cantidad ácido nucleico extraído por cada metodología, por lo tanto, el método comercial es considerado como el más eficiente debido a que presenta una alta concentración de ADN (587,86 $\text{ng}\mu\text{L}^{-1}$)

y con el método tradicional donde se obtuvo una concentración de 19,43 ng μ L⁻¹).

En la Tabla 13 también se puede apreciar el tiempo de extracción de cada metodología, determinando que el método comercial es la mejor opción, debido a que requiere una hora y media para el procesamiento de las muestras, en comparación con el método tradicional descrito por Boom et al., (1990, pp. 495-503), el cual requiere de dos días.

Según las especificaciones del fabricante *BIOTECON Diagnostics*, (2014, pp. 1), establece que la metodología comercial es un método totalmente optimizado y validado, lo que se corrobora con los resultados obtenidos en el análisis de cada uno de los parámetros antes mencionados en el presente proyecto, en el cual se ratifica que el método comercial es la mejor alternativa para futuros análisis de muestras.

Tabla 13

ADN mitocondrial bovino por dos métodos de extracción diferentes.

Método de extracción	Absorbancia (nm)			Concentración de ADN ng μ L ⁻¹	Tiempo
	A-280	260/280	260/230		
Método tradicional	0,33	2,01	0,08	19,43	2 días
Método comercial	8,61	1,89	1,86	587,86	1,5 h

5.1.2. Comparación de dos métodos de extracción por medio de la obtención de controles positivos.

En la Figura 15, se puede visualizar los dos métodos de extracción empleados en la obtención de controles positivos de ADN mitocondrial, con un tamaño de amplicon de 165 pb, el cual era el esperado de acuerdo a los cebadores utilizados para el análisis en la especie bovina.

Este ensayo determinó cualitativamente al método comercial como la mejor opción por presentar bandas más claras y estables (Figura 15a), en comparación con la metodología tradicional en donde se aprecian bandas tenues (Figura 15b), corroborando de esta manera los resultados obtenidos en el presente proyecto con varios estudios como (Asghar et al., 2015, pp. 132-138; Sánchez et al., 2013, pp. 186-192) donde se demuestra que los métodos comerciales presentan mayor estabilidad de las bandas, mayor pureza, menor degradación del ADN, menor tiempo de procesamiento y una mayor concentración de ADN, a pesar de sus altos costos el beneficio que se obtiene es relativamente significativo.

Según Chen et al., (2010, pp.1-2) el método de extracción comercial aporta mejores resultados, porque emplea compuestos como la proteínasa k, la cual inactiva las enzimas nucleasas (RNasas) y/o (DNasas), las mismas que hidrolizan el ARN y ADN respectivamente. Además, este compuesto ayuda en la digestión de proteínas con el fin de obtener ADN puro y libre de inhibidores de la PCR, corroborándose con los resultados obtenidos en los ensayos previamente analizados en el presente proyecto en donde se observa claramente que el método comercial extrae una mayor cantidad de ácidos nucleicos, integridad de la banda esperada y no existió ningún tipo de inhibición en la PCR.

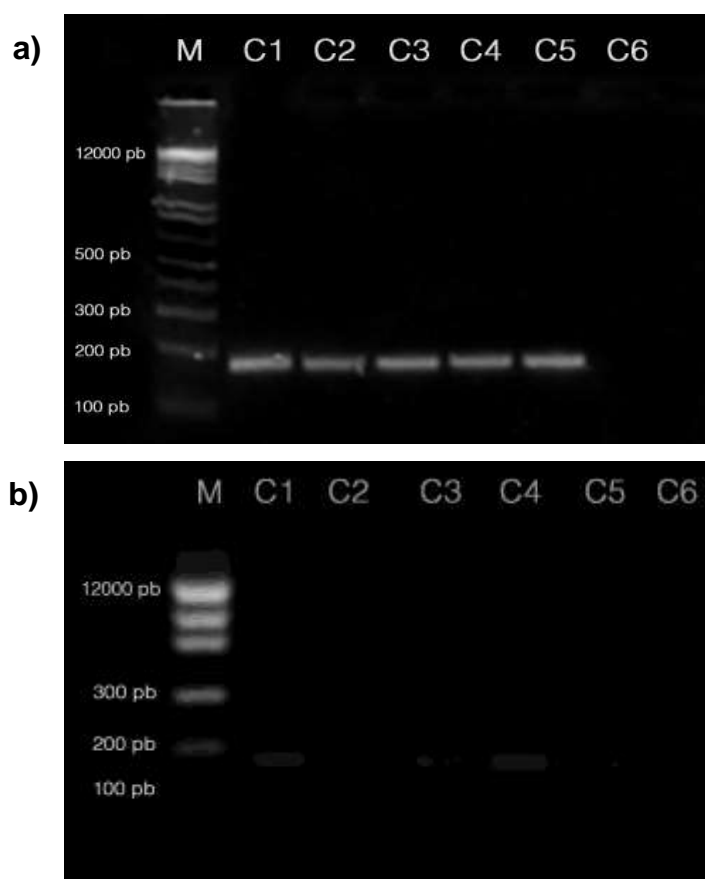


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de Controles positivos de ADN mitocondrial bovino.

- a) Extracción comercial (*foodproof Sample Preparation Kit III BIOTECON Diagnostics*).
- b) Extracción tradicional según Boom et al., (1990, pp. 495-503).
- c) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- d) Carril C1-C5: Extracción de ADN mitocondrial.
- e) Carril C6: Control negativo

5.1.3. Comparación de dos métodos de extracción por la sensibilidad analítica

En la Figura 16 y 17, se puede visualizar el ensayo de sensibilidad analítica en los dos métodos de extracción de ADN mitocondrial en distintas concentraciones de piensos infectados con restos bovinos, con el fin de establecer cualitativamente cual metodología presenta un mayor límite de detección de residuos bovinos.

El método tradicional de extracción según Boom et al., (1990, pp. 495-503), presentó un límite de detección del 1% (Figura 16), en comparación con el método de extracción comercial, en donde se detecta 0,1 a 0,05% (Figura 17), de restos bovinos, estos resultados reflejan que el método comercial presenta una mayor límite de detección, en comparación con el ensayo de Corona et al., (2007, pp.312-317) en donde emplea un método tradicional de extracción y solo detecta hasta 1% de residuos bovinos en piensos, a pesar de que los cebadores y las condiciones de amplificación son las mismas en las dos metodologías existe una notable diferencia en el límite de detección.

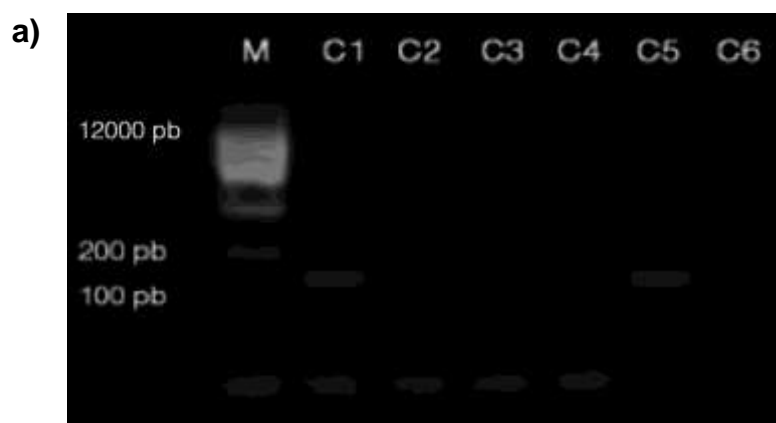


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de Sensibilidad analítica de piensos infectados con restos bovinos.

- a) Extracción tradicional según Boom et al., (1990, pp. 495-503).
- b) Extracción comercial (*foodproof Sample Preparation Kit III BIOTECON Diagnostics*).
- c) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- d) Carril C1-C4: Escala de contaminación de piensos con restos bovinos
- e) Carril C5: Control positivo
- f) Carril C6: Control negativo

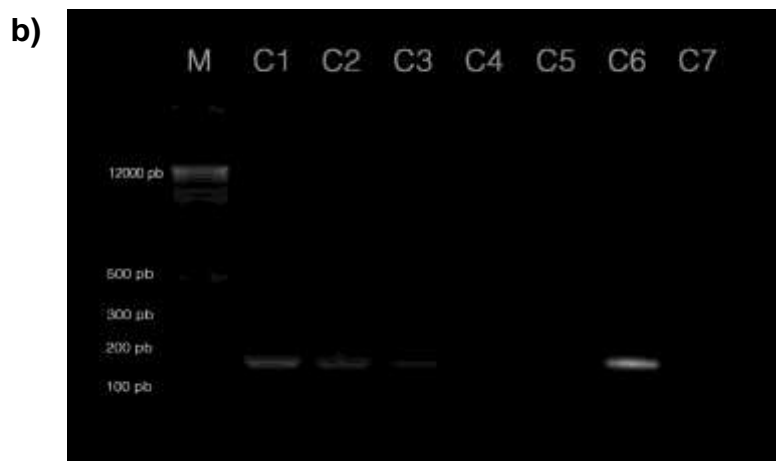


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de Sensibilidad analítica de piensos infectados con restos bovinos.

- a) Extracción tradicional según Boom et al., (1990, pp. 495-503).
- b) Extracción comercial (*foodproof Sample Preparation Kit III BIOTECON Diagnostics*).
- c) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- d) Carril C1-C5: Escala de contaminación de piensos con restos bovinos
- e) Carril C6: Control positivo
- f) Carril C7: Control negativo

5.2. Estandarización de la PCR para la detección de ADN mitocondrial bovino

La estandarización de la PCR se basó en las condiciones descritas por Corona et al., (2007, pp.312-317) en donde se detallan secuencias de los cebadores, temperaturas de hibridación, concentración de cebadores y de $MgCl_2$, pero gracias a la realización de varios ensayos se modificó de acuerdo a las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD.

5.2.1. Optimización de la temperatura de alineamiento.

La temperatura de alineamiento reportada por Corona et al., (2007, pp.312-317) para los cebadores B1 y B2 es de 58°C y de acuerdo al ensayo realizado con el gradiente de temperatura de 57 a 62°C, se corrobora que la mejor temperatura es 58°C como se observa en el carril 6 (C6) de la Figura 18 y en el carril 3 (C3) de la Figura 19.

Según los estudios de (Bolívar et al., 2014, pp.25-33; Kramer et al., 2001, pp.1-2), las temperaturas de alineamiento recomendadas para la amplificación oscilan entre 50 y 65°C, debido a que si la temperatura de alineamiento es muy baja se obtendrá una PCR menos específica y si la temperatura es muy alta, la especificidad será mayor, pero si excede en el rango no se amplificará nada debido a que la unión de los oligonucleótidos con sus sitios complementarios será poco estable y la polimerasa no podrá realizar la síntesis. Dichos ensayos se relacionan con el gradiente de temperatura del presente proyecto.

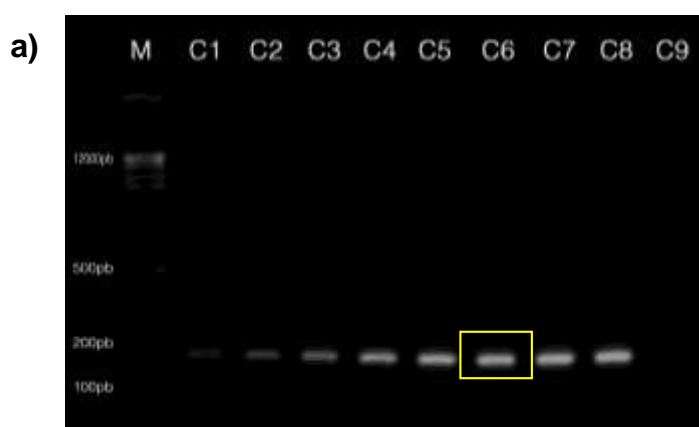


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de Gradiente de temperatura de hibridación de ADN mitocondrial bovino.

- a) ADN mitocondrial obtenido de harina de hueso bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- b) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- c) Carril C1-C8: Gradiente de temperatura de hibridación de izquierda a derecha respectivamente (62,0; 61,6; 61,0; 60,1; 58,9; 58,0; 57,3; 57,0°C)
- d) Carril C9: Control negativo

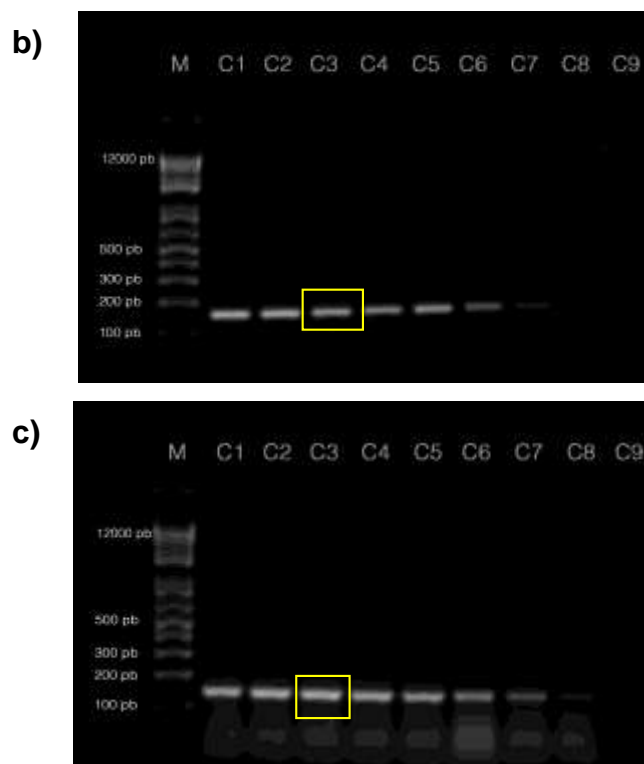


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de Gradiente de temperatura de hibridación de ADN mitocondrial bovino.

- a) ADN mitocondrial obtenido de harina de hueso bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- b) ADN mitocondrial obtenido de sangre de bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- c) ADN mitocondrial obtenido de piensos infectados con restos bovinos. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- d) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- e) Carril C1-C8: Gradiente de temperatura de hibridación de izquierda a derecha respectivamente (57,0; 57,3; 58,0; 58,9; 60,1; 61,0; 61,6; 62,0°C).
- f) Carril C9: Control negativo

5.2.2. Optimización de la concentración de cebadores

Se evaluó la concentración final de los cebadores en un rango de 0,2 a 0,8 μM , como se puede observar en la Figura 20, donde la mejor concentración de cebadores para la amplificación es 0,5 μM como se observa en el carril 4 (C4), en donde se visualiza una banda más clara en comparación con las concentraciones inferiores donde se observa bandas tenues y poco definidas.

En la Figura 21, se puede observar la evaluación de la concentración inicial de 25 μM y 10 μM en las tres muestras planteadas, determinando que la mejor concentración es 25 μM (C1-C3) ya que cualitativamente se aprecian bandas definidas.

Para un adecuado rendimiento de la PCR, la concentración de cebadores debe ser la óptima, ya que si existe mucha cantidad podría generarse un aumento en el rendimiento ocasionando productos inespecíficos, y si la cantidad es excesivamente alta los oligos forman dímeros y no se unen adecuadamente al ADN, impidiendo de esta manera una amplificación del producto problema. Una baja concentración puede ocasionar que no se amplifique absolutamente nada dando lugar a un rendimiento demasiado bajo, por lo tanto, es crucial realizar varios ensayos de la concentración hasta determinar el óptimo, por lo tanto, la concentración seleccionada, es la adecuada porque permite una correcta amplificación sin la presencia de dímeros de los cebadores, productos inespecíficos y no requiere excesos de reactivos (Espinosa, 2007, pp.517-530).

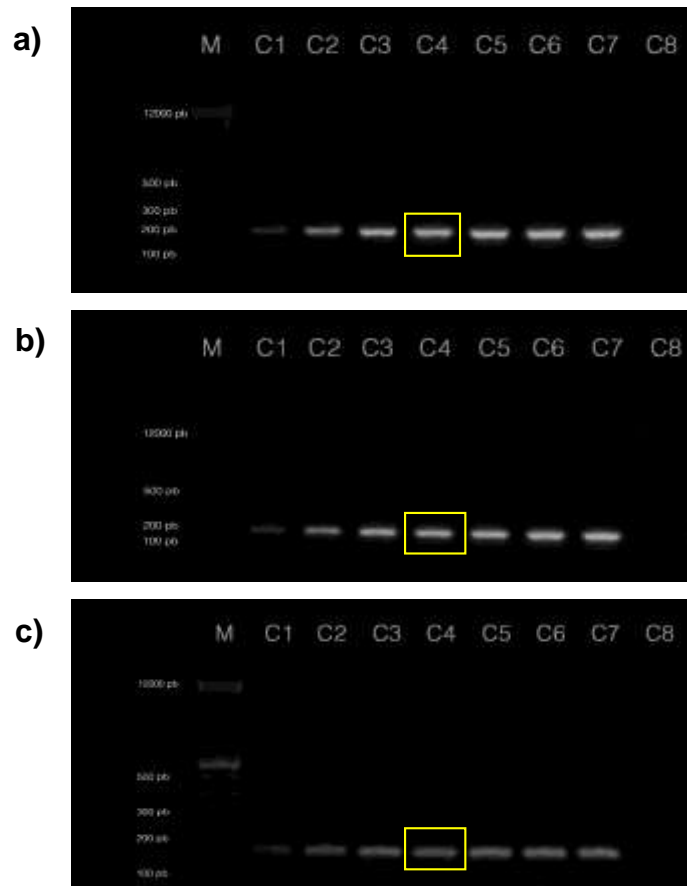


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de Gradiente de concentración de cebadores B1 y B2 de ADN mitocondrial bovino.

- a) ADN mitocondrial obtenido de harina de hueso bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON.
- b) ADN mitocondrial obtenido de sangre de bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON.
- c) ADN mitocondrial obtenido de piensos infectados con restos bovinos. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON.
- d) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- e) Carril C1-C7: Gradiente de concentración de cebadores de izquierda a derecha respectivamente (0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8 μ M).
- f) Carril C8: Control negativo.

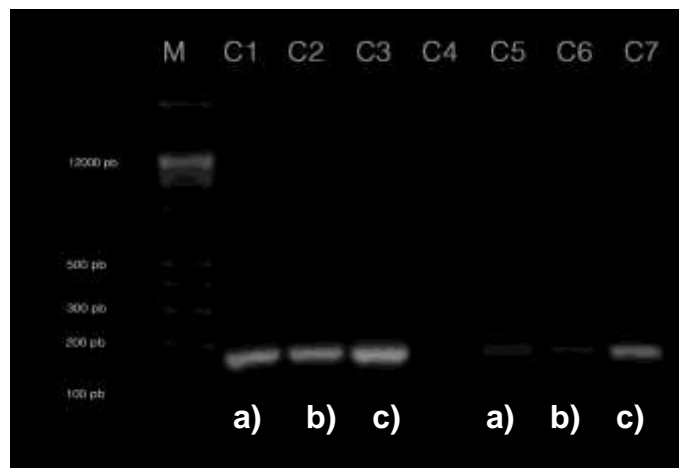


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de Concentración inicial de los cebadores B1 y B2 a partir de ADN mitocondrial.

- a) ADN mitocondrial obtenido de harina de hueso bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- b) ADN mitocondrial obtenido de sangre de bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- c) ADN mitocondrial obtenido de piensos infectados con restos bovinos. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- d) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- e) Carril C1-C3: Concentración de cebadores B1 y B2 de 25µM
- f) Carril C4: Control negativo.
- g) Carril C5-C7: Concentración de cebadores B1 y B2 de 10µM

5.2.3. Optimización de la concentración de $MgCl_2$

En la Figura 22, se puede observar el gradiente de concentración de $MgCl_2$, el cual se analizó en un rango de 1-4 mM, y se determinó que la mejor concentración es 2,5 mM (C4), debido a que se visualiza una banda definida y clara, lo cual indica una óptima amplificación del gen *CYTB* citocromo b del ADN mitocondrial bovino. Este resultado se corroborando con el ensayo de Corona et al., (2007, pp.312-317) donde propone una concentración de 2,5 mM $MgCl_2$ para una adecuada amplificación de la PCR.

Kramer y Coen, (2001, pp.1-2) mencionan en sus estudio que la concentración de $MgCl_2$ es un factor muy importante a evaluar, debido a que actúa como

cofactor de la enzima, por lo tanto una baja concentración provoca un bajo rendimiento de la enzima *Taq polimerasa*, impidiendo la unión de los cebadores a la secuencia, generando una ausencia de la banda esperada, mientras que una elevada concentración ocasiona la acumulación de productos inespecíficos debido a que los cebadores amplifican secuencias no específicas. Dichos efectos serían los que ocurrieron en el presente ensayo con bajos y altos contenidos de $MgCl_2$ y que dieron a que 2,5 mM sea la mejor concentración.

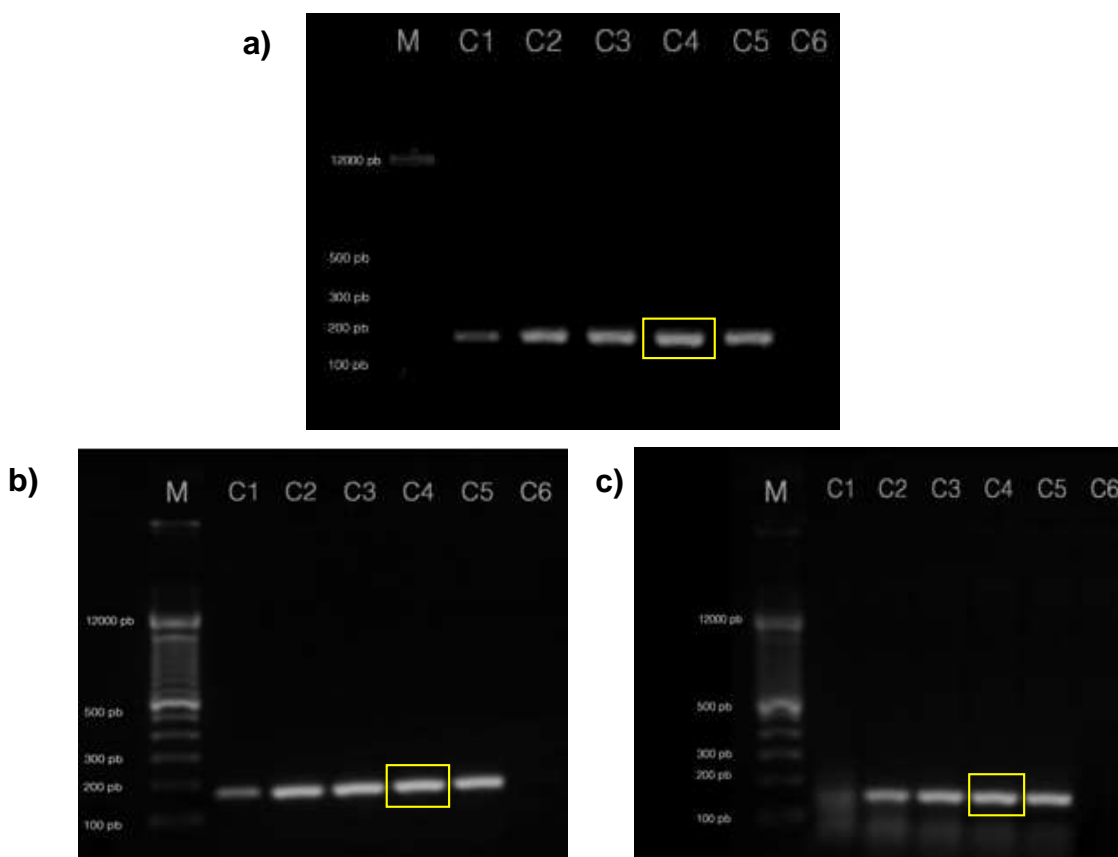


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de Gradiente de concentración de $MgCl_2$ a partir de ADN mitocondrial.

- a) ADN mitocondrial obtenido de harina de hueso bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- b) ADN mitocondrial obtenido de sangre de bovino.
- c) ADN mitocondrial obtenido de piensos infectados con restos bovinos.
- d) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- e) Carril C1-C5: Gradiente de concentración de $MgCl_2$ de izquierda a derecha respectivamente (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mM).
- f) Carril C6: Control negativo.

5.3. Verificación de la integridad de los controles positivos

En la Figura 23, se puede visualizar que no existe ninguna degradación del ADN mitocondrial bovino, debido a que las bandas se muestran claras y definidas hasta 60 días de conservación a una temperatura de -80°C , lo que resulta importante para posibles ensayos a futuro.

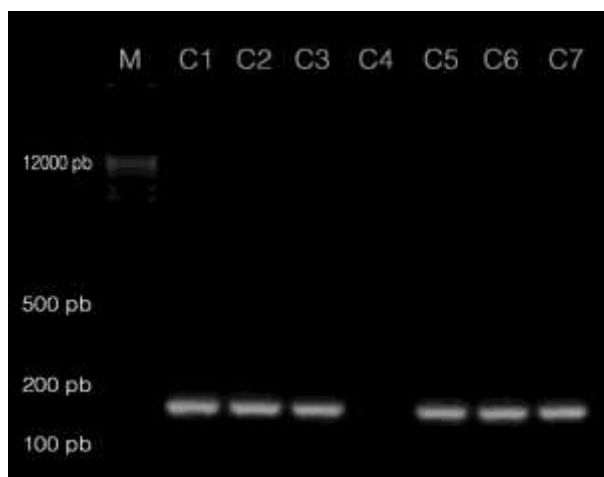


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de Verificación de la integridad de controles positivos a partir de ADN mitocondrial.

- a) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- b) Carril C1-C3: Días de realizada la extracción de ADN mitocondrial obtenido de harina de hueso bovino de izquierda a derecha respectivamente (1; 30; 60 días).
- c) Carril C4: Control negativo.
- d) Carril C5-C7: Días de realizada la extracción de ADN mitocondrial obtenido de sangre de bovino de izquierda a derecha respectivamente (1; 30; 60 días).

5.4. Sensibilidad analítica

En la Figura 24, se observa un ensayo del límite de detección de restos bovinos en piensos a través de distintos niveles de contaminación con harina de hueso bovino, determinando que la PCR detecta hasta 0,05% (C5) lo que corresponde a un valor menor a $1 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ de restos bovinos, a pesar de que la banda es muy tenue este ensayo tiene un alto límite de detección en comparación con el 1% de detección reportado por Corona et al., (2007, pp.312-317).

En la Figura 25 a, se observa una sensibilidad analítica a partir de diluciones seriadas de los controles positivos, en donde se puede determinar que el límite de detección corresponde a dilución 1:1000 (C4). En la Figura 25 b, se observa una sensibilidad analítica a partir de un pienso contaminado con el 2% de restos bovinos, determinado que el límite de detección corresponde a dilución 1:100 como se observa en el carril 3 (C3).

La determinación de la sensibilidad analítica tanto para piensos infectados con restos de bovinos, así como las diluciones seriadas en controles positivos de ADN mitocondrial bovino, es altamente eficiente ya que detecta hasta 0,05% (Figura 24 carril C5) o $1 \text{ ng}\mu\text{L}^{-1}$ de restos bovinos, convirtiéndolo en un ensayo altamente sensible y más eficiente que a lo reportado por Corona et al., (2007, pp.312-317) que solo detecta 1% de restos bovinos en alimentos balanceados.



Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de Sensibilidad analítica en piensos infectados con harina de hueso bovino.

- a) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- b) Carril C1-C5: Escala de infección de piensos con harina de hueso bovino
- c) Carril C6: Control positivo.
- d) Carril C7: Control negativo.

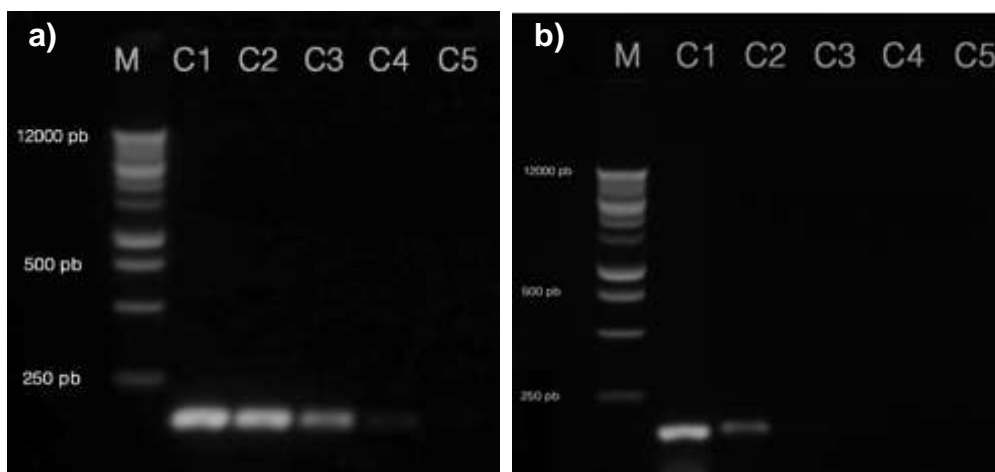


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe de Sensibilidad por diluciones seriadas de ADN mitocondrial bovino.

- a) ADN mitocondrial obtenido de harina de hueso bovino. Extracción por medio de un juego comercial BIOTECON
- b) ADN mitocondrial Obtenido de pienso infectado con 2% de harina de hueso bovino
- a) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- b) Carril C1: Sin dilución
- c) Carril C2-C5: Diluciones seriadas de izquierda a derecha respectivamente (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000).

5.5. Especificidad analítica

En la Figura 26 se puede verificar la especificidad de los cebadores B1 y B2 para la especie bovina, debido a que se observa únicamente la amplificación del ADN mitocondrial de esta especie, y no se visualiza ninguna amplificación de las otras dos especies porcino y ovino (C2 y C3 de la Figura 25) respectivamente. Además, se puede determinar que no existe ninguna inhibición de la PCR al momento de la interacción de dos tipos de ADN mitocondrial de diferentes especies animales como se observa en los carriles 4 y 5 (C4 y C5) de la Figura 25.

El ensayo cualitativo antes mencionado permite corroborar la especificidad mediante una prueba *in silico* realizado en el programa Primer-Blast, en donde los cebadores B1 y B2, solo amplifican una región conservada del genoma mitocondrial de la especie bovina.

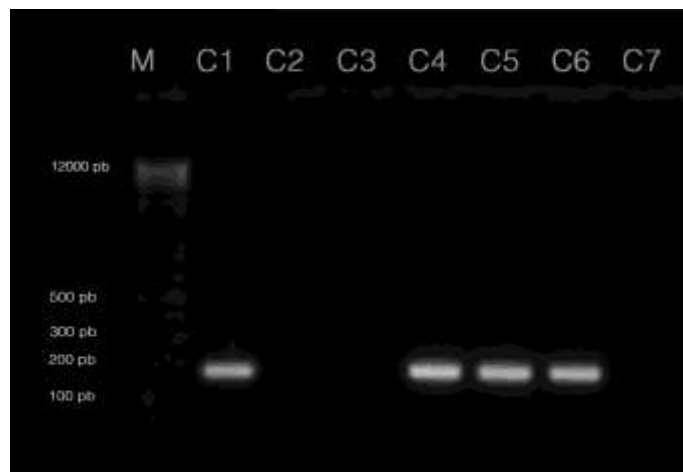


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR Safe* de la Especificidad analítica empleando los cebadores B1 y B2.

- a) Carril M: Marcador de peso molecular de 1Kb.
- b) Carril C1: Extracción de ADN mitocondrial de bovino.
- c) Carril C2: Extracción de ADN mitocondrial de porcino.
- d) Carril C3: Extracción de ADN mitocondrial de ovino.
- e) Carril C4: Extracción de ADN mitocondrial de bovino con porcino
- f) Carril C5: Extracción de ADN mitocondrial de bovino con ovino
- g) Carril C6: Control positivo
- h) Carril C7: Control Negativo.

5.6. Estandarización y validación de la PCR

La Tabla 14 y 15 indica la estandarización de la PCR ha ser empleada como metodología de diagnóstico en el Laboratorio de Biología Molecular de AGROCALIDAD. Además, se realizó un ensayo el cual permitió validar la técnica con seis muestras de campo provenientes de las provincias de Azuay, Chimborazo, Guayas, Pichincha y Tungurahua. Las seis muestras de piensos analizadas resultaron ser negativas es decir que no han sido elaboradas con restos de bovinos y cumplen con la normativa de AGROCALIDAD Resolución 88.

Tabla 14.

Volúmenes y concentraciones para la preparación de la mezcla de PCR

Reactivo	Concentración		Vol. X1 (μ l)
	Inicial	Final	
H ₂ O	NA	NA	13,13
Buffer PCR Green Flexi	5 X	1 X	5
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTP's	10 mM	0,25 mM	0,625
Cebador B1	25 μ M	0,5 μ M	0,5
Cebador B2	25 μ M	0,5 μ M	0,5
Enzima Go Taq Hot Start	5 U/ μ l	2,5 U/50 μ l	0,25
Volumen de mezcla			22,5

Nota. Volumen de la Reacción final 25 μ l= 22,5 μ l PCR mix + 2,5 μ l ADN

NA= No asignado

5X= Significa agregar una parte de la solución concentrada y 4 partes de solvente.

1X= Significa agregar una parte de la solución concentrada

Vol. X1= Volumen para una reacción final.

Tabla 15.

Perfil térmico de amplificación de una región conservada del genoma mitocondrial bovino

N° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min: s)
1	95	02:00
	94	01:00
30	58	01:00
	72	01:30
1	72	10:00
1	12	∞^*

Nota. ∞^* = Infinito

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

La técnica de PCR convencional con los cebadores B1 y B2 es una herramienta de diagnóstico rápida para la detección de restos bovinos en piensos como medida preventiva de la Encefalopatía Espongiforme Bovina en Ecuador.

El método de extracción de ADN mitocondrial bovino en piensos resultó ser más eficiente con el kit de extracción comercial *BIOTECON Diagnostics-foodproof®Sample Preparación Kit III*, ya que permite atrapar la mayor cantidad de ADN mitocondrial de los alimentos sin que exista degradación del mismo.

Los cebadores empleados son específicos para la detección de ADN mitocondrial de la especie *Bos Taurus* y la región de amplificación es el gen *CYTB* citocromo b,

El límite de detección fue de 0,05% de restos bovinos en piensos, con el empleo del método de extracción comercial y los cebadores B1 y B2 en la PCR, determinando que este método es altamente sensible como método diagnóstico.

Las condiciones óptimas para la estandarización de la PCR, fueron una temperatura de alineamiento de 58°C, una concentración de cebadores de 0,5 µM y una concentración de MgCl₂ de 2,5 mM, todos los valores mencionados se encuentran dentro de los rangos establecidos por fuentes bibliográficas.

6.2. Recomendaciones

Realizar un muestreo en todas las provincias del Ecuador con la finalidad de dar cumplimiento a la normativa de AGROCALIDAD según la resolución 088, la cual prohíbe que se elabore piensos para rumiantes con restos de bovinos como programa de prevención y vigilancia de la Encefalopatía Espongiforme Bovina.

Realizar más ensayos de sensibilidad analítica en piensos infectados con restos bovinos con el objetivo de validar el límite de detección en el protocolo estandarizado.

Evaluar cuales son los posibles componentes de los alimentos balanceados que podrían inhibir la PCR.

REFERENCIAS

- AGROCALIDAD. (2016). Ecuador libre de Encefalopatía Espongiforme Bovina. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Recuperado el 02 de octubre de 2017 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/08/48-resolucion-088-encefalopatia-espongiforme-bovina.pdf>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Recuperado el 02 de octubre de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
- Almazán, J., Avellanal, F., Alcalde, E., Ruíz, M., & Cuesta, J. de P. (2010). Encefalopatías espongiformes transmisibles humanas en España. Recuperado el 02 de octubre de 2017 de <http://revista.isciii.es/index.php/bes/article/view/166>
- Asghar, U., Malik, M., Anwar, F., Javed, A., Raza, A. (2015). *DNA Extraction from insects by using different techniques: A Review. Advances in Entomology*, 3: 132-138. <http://dx.doi.org/10.4236/ae.2015.34016>
- Basarab, J. A., Price, M. A., Aalhus, J. L., Okine, E. K., Snelling, W. M., & Lyle, K. L. (2003). *Residual feed intake and body composition in young growing cattle. Canadian Journal of Animal Science*. 83(2), 189-204. <https://doi.org/10.4141/A02-065>
- Boschini, C. (2000). Consumo de morera (*Morus alba*) y sorgo negro forrajero (*Sorghum almum*) en ganado Jersey. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=43711211>
- Brun, A., Castilla, J., & Torres, J. M. (2000). *Transmissible spongiform encephalopathy in animals*. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de <http://europepmc.org/abstract/med/10951669>
- Boesze-Battaglia, K., Dispoto, J., & Kahoe, M. A. (2002). *Association of a Photoreceptor-specific Tetraspanin Protein, ROM-1, with Triton X-100-resistant Membrane Rafts from Rod Outer Segment Disk Membranes. The Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41843–41849. e <http://doi.org/10.1074/jbc.M207111200>.

- Boom, R., Sol, C., Salimans, M., Jansen, C., Wertheim, P., Dillen, V., Noordaa, V. (1990). *Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. Journal of clinical microbiology*. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de <http://jcm.asm.org/content/28/3/495.short>
- Boom, R., Sol, C., Beld, M., Weel, J., Goudsmit, J., & Wertheim-van Dillen, P. (1999). *Improved Silica-Guanidinium thiocyanate DNA Isolation Procedure Based on Selective Binding of Bovine Alpha-Casein to Silica Particles. Journal of Clinical Microbiology*. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de <http://jcm.asm.org/content/37/3/615.short>
- Bolivar, A., Rojas, A., y Garcia, L. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de <http://www.redalyc.org/html/3313/331330398005/>.
- Cadavid, I., Rosero, D. y Uribe S. (2013). Comparación de dos métodos de extracción de ADN a partir de plantas del género Solanum, subgénero Leptostemonum. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Vol 15 (2): 186- 192. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41747>
- Cancho Grande, B., García Falcón, M. S., & Simal Gándara, J. (2000). El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Recuperado el 12 de noviembre de 2017 de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=72430206>
- César, D. (2004). Encefalopatía Espongiforme Bovina. Recuperado el 12 de noviembre de 2017 de https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R111/R111_44.pdf
- Corona, B., Leonard, R., Carpio, Y., Uffo, O., Martínez, S. (2007). *PCR detection of DNA of bovine, ovine-caprine and porcine origin in feed as part of a bovine spongiform encephalopathy control program. Spanish Journal of Agricultural Research*. Vol.5:312-317. <http://doi.org/10.5424/sjar/2007053-5342>
- Collinge, J. (2001). *Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. Annual Review of Neuroscience*. Vol. 24:519-550. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.519>

- Chen, H, Rangasamy, M, Tan, S, Wang, H, Siegfried, B. (2010). *Evaluation of Five Methods for Total DNA Extraction from Western Corn Rootworm Beetles*. PLOS ONE 5(8): e11963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Chuisaca, G., & Miguel, J. (2011). Encefalopatía espongiiforme bovina. Recuperado el 12 de noviembre de 2017 de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3063>
- Duque-Velásquez, J. C., Villegas, A., & Rodas, J. D. (2010). Encefalopatías espongiiformes transmisibles: biología del prion y estado actual de la vigilancia epidemiológica en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(2). Recuperado el 21 de noviembre de 2017 de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=295023450013>
- Delgado-Hachmeister, J. E., Rangel-Frausto, M. S., & León, S. P. de. (2002). Encefalopatías espongiiformes transmisibles. Recuperado el 16 de noviembre de 2017 de <https://www.scielosp.org/article/spm/2002.v44n1/69-75/es/>
- Deborah C. (2004). Encefalopatía Espongiiforme Bovina. Recuperado el 15 de octubre del 2017 de http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R111/R111_44.pdf
- Eigen, M. (2001). Priones y encefalopatía espongiiforme bovina. Recuperado el 17 de octubre del 2017 de http://www.mclibre.org/otros/daniel_tomas/2bachillerato/17_PrionesyEEB.pdf
- El Telégrafo. (2016). Ecuador exportaría \$ 65 millones de carne de res en 2017. Recuperado el 13 de diciembre de 2017 de <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/ecuador-exportaria-65-millones-de-carne-de-res-en-2017>
- Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas. (s.f.). Ingredientes de los piensos. Recuperado el 22 de noviembre de 2017 de <http://www.etsiaab.upm.es/>
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Recuperado el 22 de noviembre de 2017 de

- <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/530/cap17.pdf>
- Eigen, M. (2001). Priones y Encefalopatía Espongiforme Bovina. Investiga y Ciencia. Recuperado el 22 de noviembre de 2017 de http://www.mclibre.org/otros/daniel_tomas/2bachillerato/17_PrionesyEEB.pdf
- Farías, Núñez, Padilla, & Goicoechea. (2004). Patologías producidas por priones. Laboratorio de Fisiopatología y Toxicología, Departamento de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Recuperado el 22 de noviembre de 2017 de <http://patologiaveterinaria.cl/Monografias/Numero1/01.htm>
- Farías R., Gustavo, Hernán Garces A., Julio Larenas H., Ana M. Ramirez K., & Claudio Lecocq P. (2011). Enfermedades producidas por priones en los Animales. Avances en Ciencias Veterinarias. Recuperado el 25 de noviembre de 2017 de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129431/enfermedades-producidas-por-priones-en-los-animales.pdf?sequence=1>
- Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA). (2010). Ingredientes para piensos. Recuperado el 25 de noviembre de 2017 de <http://www.fundacionfedna.org/ingredientes-para-piensos>
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), (2016). Estructura del agente etiológico de la Encefalopatía espongiforme bovina. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de [https://www.ica.gov.co/getdoc/9a20d5a4-2cc0-4bde-b8fc-d4fd7ef3a7bc/Encefalopatia-Espongiforme-Bovina-\(EEB\).aspx](https://www.ica.gov.co/getdoc/9a20d5a4-2cc0-4bde-b8fc-d4fd7ef3a7bc/Encefalopatia-Espongiforme-Bovina-(EEB).aspx)
- Kim, M., Lee, S.-H., Min, J., Kobayashi, F., Um, H.-J., & Kim, Y.-H. (2011). *The Utilization of Triton X-100 for Enhanced Two-Dimensional Liquid-Phase Proteomics. Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 213643. <http://doi.org/10.1155/2011/213643>
- Kalmár, T., Bachrati, C. Z., Marcsik, A., & Raskó, I. (2000). *Nucleic Acids Research*, Vol.28(12), e67. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e67>
- Kramer, M. & Coen, D. M. (2001). *Enzymatic amplification of DNA by the polymerase chain reaction: standard procedures and optimization.*

Current Protocols in Molecular Biology, Vol.2:15.1.1.-15.1.7.
<https://doi.org/10.1002/0471140856.txa03cs03>

- Nanclares, N. (2003). Una aproximación a la Encefalopatía Espongiforme bovina ya sus consecuencias. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de https://www.researchgate.net/profile/Nuria_Hernandez_Nanclares/publication/28279308_Una_aproximacion_a_la_Encefalopatia_Espongiforme_bovina_y_a_sus_consecuencias/links/09e4150b8a254dea4d000000/Una-aproximacion-a-la-Encefalopatia-Espongiforme-bovina-y-a-sus-consecuencias.pdf
- Lecocq C, F. G., Garces, H, L. J., & Ramirez A. (2011). Enfermedades Producidas por Priones en los Animales. Recuperado el 26 de octubre de 2017 de <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/129431/enfermedades-producidas-por-priones-en-los-animales.pdf?sequence=1>
- Lozano J. (2003). ADN Mitocondrial. Universidad de Murcia. Facultad de Medicina. Recuperado el 10 de diciembre de 2017 de http://cienciaysalud.laverdad.es/8_4_46.html
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2013). Encefalopatía Espongiforme Bovina. Organización Mundial de Sanidad Animal. Recuperado de: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/eeb/estatus-sanitario-oficial/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2016). Portal sobre EEB. Recuperado de: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/portal-sobre-eeb/>
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). (2017). Estatus de los Países Miembros respecto de la Encefalopatía espongiforme bovina. Recuperado el 21 de octubre de 2017 de: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/eeb/estatus-sanitario-oficial/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, mundialmente (FAO). (2014). Buenas prácticas para la industria de

piensos. Recuperado el 21 de octubre de 2017 de <http://www.fao.org/3/a-i1379s.pdf>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, mundialmente (FAO). (1998). Sistemas de calidad e inocuidad de los alimentos. Manual de capacitación sobre higiene de los alimentos y sobre el sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC). Recuperado el 22 de noviembre de 2017 de <http://www.fao.org/docrep/005/W8088S/W8088S00.HTM>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, mundialmente (FAO). (2003). Código Internacional de prácticas recomendado - Principios Generales de Higiene de los Alimentos - CAC/RCP. Recuperado el 22 de noviembre de 2017 de http://www.fao.org/ag/agn/CDfruits_es/others/docs/CAC-RCP1-1969.PDF

Pinto, G. B., Espinoza, J., Juliá, S., Viera, F. J. B., & Aponte, P. M. (2016). Encefalopatía Espongiforme Bovina y su diagnóstico. Recuperado el 21 de noviembre de 2017 de <http://www.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorescalidad/index.php/revista/article/view/17>

Prusiner, S. B., & Hsiao, K. K. (1994). *Human prion diseases*. *Annals of Neurology*, 35(4), 385-395. Recuperado el 18 de noviembre de 2017 de <https://doi.org/10.1002/ana.410350404>

Sotelo F. (2010). Muestreo de Encefalopatía Espongiforme Bovina en la Región de Gómez Palacio, Durango. Recuperado el 21 de noviembre de 2017 de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3070/FERNANDO%20SOTELO%20ARANDA.pdf?sequence=1>

Thermo Fisher Scientific. (2013). *NanoDrop 8000 Spectrophotometer*. *NanoDrop Products*, Recuperado el 03 de diciembre de 2017 de www.nanodrop.com

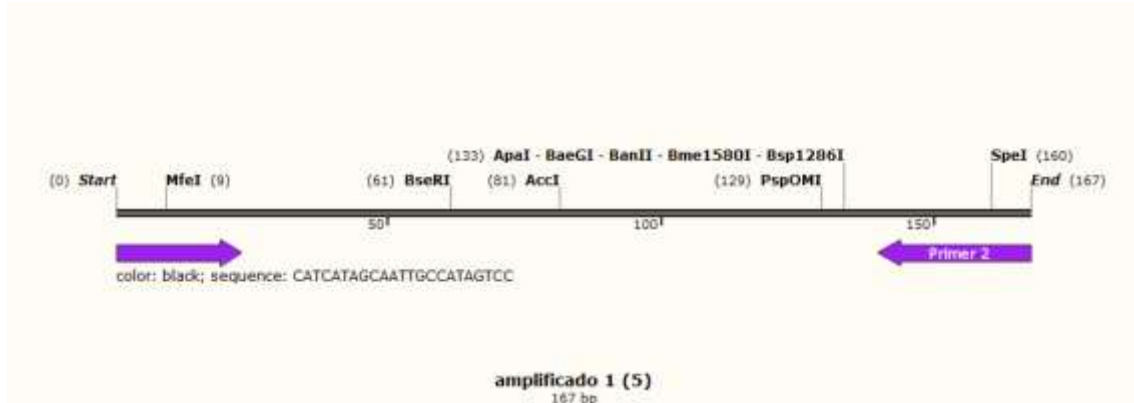
Torres, JM; Brun, A; Castilla, J. y Sánchez-Vizcaíno, JM, (s.f.). Enfermedades producidas por priones. Epidemiología y transmisión de algunas EETs

- Recuperado el 21 de noviembre de 2017 de <http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/bse/priones/priones3.htm>
- Toro, G., Pacheco, O. E., Sierra, U. E., Beltrán, M., Díaz, A., Parra, E. A., & Bonilla, E. (2005). Encefalopatías sub agudas espongiiformes transmisibles (ESET). Recuperado 6 de febrero de 2018, de http://www.acnweb.org/acta/2005_21_2_134.pdf
- Toyoda, A, Nakajo, M, Kawachi, H, Matsui, T. y Yano, H. (2004). *PCR detection of bovine mitochondrial DNA derived from meat and bone meal in feed. Journal of Food Protection*, Vol. 67, No. 12, pp. 2829–2831. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.12.2829>
- Vargas, A., Salto, R., Sola, M., & Hortelano, P. (2017). Encefalopatías espongiiformes transmisibles. Bases moleculares, diagnóstico y perspectivas terapéuticas. Recuperado 6 de febrero de 2018, de <http://digibug.ugr.es/handle/10481/28254#.WqFLJOjOwM8>
- Verdecia M, R. T. (2009). Enfermedades priónicas. Recuperado 6 de febrero de 2018, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192009000400008

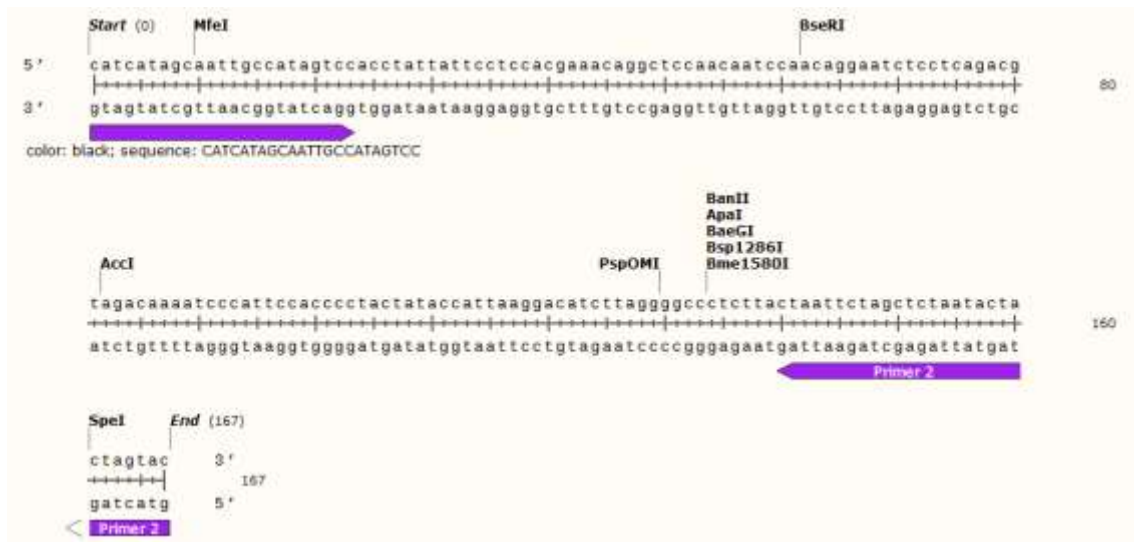
ANEXOS

Anexo 1. PCR virtual para los cebadores B1 y B2

Mapa de la PCR virtual para los cebadores B1 y B2 del amplificado 1



Secuencia de la PCR virtual para los cebadores B1 y B2 del amplificado 1



Mapa de la PCR virtual para los cebadores B1 y B2 del amplificado 2

