

# SISTEMA PCR/DGGE PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS EN EL TORRENTE SANGUÍNEO DE BOVINOS ESTABLECIDOS EN REGIONES GANADERAS DEL ESTADO MÉRIDA, VENEZUELA

PCR/DGGE System for detection of microorganisms in bovine blood stream established in cattle livestock regions of Merida State, Venezuela

Ana María Bolívar<sup>1\*</sup>, Agustina Rojas-Estaba<sup>2</sup>, Yzoleth Torres<sup>3</sup> y Pablo García-Lugo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Investigaciones Parasitológicas "J. M. Rangel", Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. <sup>2</sup> Investigaciones Parasitológicas "J. F. Torrealba", Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. <sup>3</sup> Laboratorio de Biotecnología "S. D. Rojo", Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. \* Correspondencia: ambolivar@hotmail.com

## RESUMEN

El estudio presenta la detección de bacterias y parásitos en sangre de bovinos, en zonas de ganadería merideña utilizando el procedimiento de biodiversidad genética denominado Sistema de análisis por Electroforesis en Geles con Gradiente Desnaturalizante de amplificados por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR/DGGE). Para tal fin se evaluó el metagenoma sanguíneo de 162 animales (115 *Bos taurus* y 47 *Bubalus bubalis*) de condición clínica inaparente, distribuidos en asentamientos ubicados entre 4 y 1947 msnm. Se obtuvo una biodiversidad de 22 microorganismos, destacando en frecuencia, a potenciales patógenos como: *Besnoitia besnoiti*, *Anaplasma marginale*, *Mycoplasma wenyonii* y *Ureaplasma urealitycum*. La utilización del sistema PCR/DGGE incrementa las posibilidades de diagnosticar agentes infecciosos en sangre, y dado que algunos microorganismos reportados son responsables de significativos daños al bovino, refleja esta ventaja biotecnológica a efectos de intervenciones en campo.

**Palabras clave:** Ganadería bovina; biodiversidad microbiana; sistema PCR/DGGE

## ABSTRACT

The study presents the detection of bacteria and parasites in bovine blood stream, in areas of cattle breeding in the Merida State, using the procedure of genetic biodiversity called Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified (PCR/DGGE). For this purpose, the blood metagenome of 162 animals (115 *Bos taurus* and 47 *Bubalus bubalis*) of inapparent clinical condition, distributed in settlements between 4 and 1947 msnm were evaluated. Biodiversity of 22 microorganisms was obtained, emphasizing in frequency, to potential pathogens such as: *Besnoitia besnoiti*, *Anaplasma marginale*, *Mycoplasma wenyonii* and *Ureaplasma urealitycum*. The use of the PCR/DGGE system increases the chances of diagnosing infectious agents in blood, and given that some reported microorganisms are responsible for significant damage to the bovine, it reflects this biotechnological advantage for the purposes of field interventions.

**Key words:** Cattle breeding; microbial biodiversity; PCR/DGGE system

## INTRODUCCIÓN

Algunos de los más importantes agentes microbianos que comprometen la salud del bovino (*Bos taurus*) se ubican en grupos taxonómicos bacterianos y parasitarios [10]. Dentro de cada grupo existen numerosos géneros, especies y hasta variantes genéticas con patogenicidad variable y distribución geográfica diversa [2, 15, 22, 46], sin embargo, aún permanecen desconocidas, prevalencias e incidencias reales para un número importante de estos agentes, circunstancia que limita la comprensión de la verdadera epizootiología en algunas áreas [11, 23, 39].

El torrente sanguíneo del bovino representa un hábitat significativo así como un potencial vehículo para numerosos microorganismos. De tal modo que el conocimiento de bacterias y parásitos que pueden detectarse en sangre es esencial a efectos de ejecutar intervenciones efectivas en campo tendientes a controlar la aparición de focos de infección y/o enfermedad y evitar o minimizar su posible difusión [11, 33, 36].

La detección tradicional de microorganismos sanguíneos involucra como primera herramienta diagnóstica, el reconocimiento e identificación de los diferentes estadios morfológicos mediante la observación microscópica directa; no obstante, el rango de características diferenciales para algunos microorganismos es limitado o indistinguible [20, 22], constituyéndose junto a la baja carga microbiana en potenciales desventajas.

Frente a esta situación, se presentan variantes del método molecular entre las que se cita la técnica de marcaje o huella genética Electroforesis en Geles de Gradiente Desnaturalizante (DGGE por sus siglas en inglés) [17, 18, 37, 38], procedimiento que ha contribuido considerablemente en la determinación y el entendimiento de la diversidad de poblaciones microbianas en el tiempo y espacio [12, 37]. El procedimiento requiere la amplificación previa de un gen altamente conservado entre especies, mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la que se utiliza un cebador con una pinza-GC que evita la disociación por completo de la doble hélice de ADN a medida que un amplicón es corrido en un gel de acrilamida con un gradiente desnaturalizante [17, 18]. De tal modo que al analizar el ADN de una población microbiana, el resultado que se obtiene son múltiples copias del gen diana (gen concreto identificativo a detectar) de todos los microorganismos presentes en esa población. Finalizada la electroforesis, las bandas resultantes se pueden identificar por comparación con bandas generadas por cepas patrón o aislar y purificar el ADN para secuenciarlo [7, 50].

La utilización del sistema PCR/DGGE en la detección de la diversidad microbiana del ambiente sanguíneo del bovino puede contribuir a aumentar las posibilidades diagnósticas más allá de los hemotrópicos considerados habitualmente patógenos. Junto a esta capacidad discriminatoria, se podría inducir potenciales panoramas de riesgo en poblaciones animales susceptibles a

otros microorganismos, fortaleciendo de este modo los campos clínicos, epizootiológicos y de investigación. Dadas estas circunstancias, se pretendió detectar poblaciones bacterianas y parasitarias en sangre de bovinos utilizando el sistema PCR/DGGE y valorar los hallazgos obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población y muestra biológica

Bovinos (*Bos taurus*) y búfalos (*Bubalus bubalis*) de condición clínica inaparente y provenientes de diversos asentamientos del estado Mérida, Venezuela, ubicados en Zona de Ganadería Alta (ZGA) y Zona de Ganadería Baja (ZGB) fueron incluidos en la investigación. Los bovinos fueron inmovilizados para la obtención de sangre por venopunción (yugular), teniendo en cuenta las normas técnicas en el manejo y sujeción de animales referente a los principios éticos internacionales para la investigación biomédica y preservación del material biológico. En cada animal se utilizó inyectora estéril descartable en sistema vacutainer® y recolección sanguínea en tubos estériles con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético EDTA (2 mg/mL), conservando los procedimientos recomendados habitualmente de manipulación y mantenimiento de las muestras hasta su llegada al laboratorio.

### Obtención del metagenoma sanguíneo

Una alícuota de 400 µL de sangre homogeneizada fue depositada en tubo cónico de centrifuga añadiendo igual volumen de buffer de lisis (Tris-base grado biología molecular [10 mM], NaCl [150 mM], agua estéril capacidad suficiente para 500 mL, pH 7,5) y 5 µL de proteinasa K (concentración final 20 mg/mL). Esta mezcla se incubó (Memmert, 800, Memmert, Alemania) a 65 °C durante dos horas (h), seguido de una nueva incubación durante 15 minutos (min) / 100 °C y posteriormente centrifugar (Eppendorf, 5415D, Eppendorf, Alemania) a 15000 g / 15 min. El sobrenadante fue trasvasado a un tubo cónico de centrifuga para proseguir con la extracción v/v fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y precipitación con etanol. El metagenoma obtenido de cada muestra fue diluido en 70 µL de agua MilliQ y mantenido a -20 °C (Frigidaire, Frigidaire-vertival, Electrolux, Suecia) hasta su uso.

### Reacciones PCR/DGGE

Las comunidades bacterianas fueron estudiadas según Muyzer y col. [37] TABLA I y las comunidades parasitarias por la metodología de Baré y col. y Díez y col. [4, 14] TABLA II.

**TABLA I**  
**DETECCIÓN DE BACTERIAS EN SANGRE DE BOVINOS. PROTOCOLO PCR/DGGE**

CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR	PRODUCTO ESPERADO <sup>(1)</sup>
p1 (341F)	5-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3	193 pb
p2 (907R)	5-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3	233 pb
p3-GC (341F-GC)	CGC CCG CCG CGC GCG CGG CGG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G 5-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3	

**TABLA II**  
**DETECCIÓN DE PARÁSITOS EN SANGRE DE BOVINOS. PROTOCOLO PCR/DGGE**

CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR	PRODUCTO ESPERADO
Euk-1209F	5-CAG GTC TGT GAT GCC C-3	210 pb
Uni-392R	5-ACG GGC GGT GTG TRC-3	310 pb
Euk-1209F-GC	CGC GCG GCC GCG CCC CGC GCC CGT CCC GCC GCC CCC GCC CG 5-CAG GTC TGT GAT GCC C-3	

Una primera reacción PCR/DGGE se realizó en volumen final 25 µL (cebadores libres de pinza-GC), utilizando concentración de reactivos y condiciones de ciclaje señalados por los autores. Cada producto amplificado fue verificado por electroforesis en gel de agarosa, coloración con Bromuro de Etidium (BrEt) y marcador de peso molecular. Evidenciada la presencia de bandas, se procedió a una reacción secundaria PCR/DGGE en volumen final 100 µL (cebadores con pinza-GC). Comprobada la amplificación, el producto restante fue precipitado con acetato de potasio (7,5 M, pH 7,5 [3,3 µL / 50µL de reacción]) y 2 volúmenes de isopropanol en frío durante 12 h, sometido a centrifugación (12000 g / 10 min), lavado con etanol 70 % y finalmente resuspendido en 20 µL de buffer de carga.

#### Condiciones de corrida DGGE

La corrida se efectuó durante 12 h a 100 voltios y temperatura constante de 60 °C en un equipo para DGGE Bio-Rad C.B.S. Scientific, EUA, utilizando geles de acrilamida de 16x16 cm x 1 mm al 8 % (acrilamida: bis-acrilamida 37:5:1 [v/v]), con un gradiente químico de desnaturalización creciente 40 a 80 % (obtenido de una mezcla de urea [7 M] y formamida [40 %] en 100 % desnaturalizante) [6].

Finalizada la electroforesis, los geles se colorearon con BrEt, visualizaron bajo luz ultravioleta (LUV) y se comparó la eficacia de la corrida empleando patrones de peso molecular.

#### Producto esperado

En el gel se observaron una o varias bandas (nombradas como Unidades Taxonómicas Operacionales [OTU's por sus siglas en inglés]). El ADN de estas bandas se extrajo mediante el método de difusión en agua desionizada estéril [14, 19]. En este sentido,

las bandas-ADN se cortaron y mantuvieron a 4 °C en tubos cónicos conteniendo 50 µL de agua MilliQ estéril. Bajo estas condiciones, el ADN eludido se amplificó en volumen final 25 µL, tomando 1 µL para su visualización en geles de agarosa (2 %). El volumen restante fue empleado para purificación adicionando acetato de amonio (v/v, 10 M) y etanol absoluto en frío. La mezcla fue incubada a -20 °C / 24 h y centrifugada a 15000 g / 20 min, decantando el sobrenadante y limpiado el ADN con etanol 70 % (v/v). El ADN se resuspendió en 15 µL de agua MilliQ estéril y 12 µL fueron enviados (siguiendo las recomendaciones para la preservación del ADN), a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (UEGF-IVIC) para su secuenciación.

#### Identificación de patrones de banda resultantes por PCR/DGGE a diferentes escalas taxonómicas mediante herramientas bioinformáticas

Obtenido el reporte de secuencias, se procedió a realizar el análisis de similitud utilizando las herramientas bioinformáticas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), de manera que se pudo predecir la identidad de los microorganismos problemas por comparación del porcentaje de identidad con las secuencias reportadas en esta base de datos.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total fueron evaluados 162 bovinos, distribuidos en 16 fincas de 6 municipios del estado: Libertador (L), Campo Elías (CE), Sucre (S), Alberto Adriani (AA), Obispo Ramos de Lora (ORL) y Caracciolo Parra Olmedo (CPO) (TABLA III, FIG. 1).

TABLA III

INFORMACIÓN DE LAS FINCAS GANADERAS EVALUADAS

Nº	ZG	M	Altitud (msnm)	Pob Vac Ev	Pob Buf Ev
1	ZGA	L	1940	15	-
2	ZGA	CE	1947	46	-
3	ZGA	S	1650	15	-
4	ZGA	S	1520	1	-
5	ZGA	S	1200	4	-
6	ZGA	S	1110	5	-
7	ZGA	S	930	5	-
8	ZGA	S	927	1	-
9	ZGB	AA	599	2	4
10	ZGB	AA	7	2	-
11	ZGB	AA	4	3	3
12	ZGB	ORL	90	1	1
13	ZGB	ORL	25	1	-
14	ZGB	ORL	4	10	38
15	ZGB	CRO	130	2	-
16	ZGB	CRO	110	2	1
				115	47

Nº: número asignado a la finca, ZG: zona ganadera de procedencia, M: municipio, PobVacEv: población vacuna evaluada, PobBufEv: población bufalina evaluada.

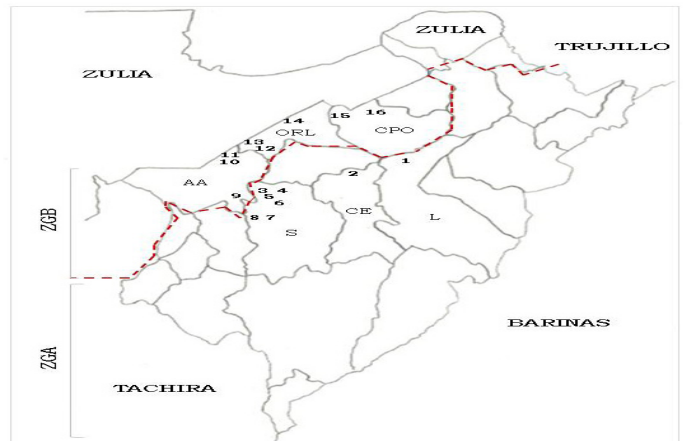


FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS SISTEMAS GANADEROS EVALUADOS DENTRO DE LOS MUNICIPIOS DEL ESTADO MÉRIDA. ZGA: L, CE Y S. ZGB: AA, ORL Y CRO. LÍNEA PUNTEADA: DIVISIÓN TERRITORIAL DE LAS ZONAS GANADERAS.

Se contabilizaron 115 *B. taurus* (92 en ZGA y 23 en ZGB) y 47 *B. bubalis* (todos en ZGB). En fincas de la ZGA, el vacuno fue la única especie productora, mientras que en la ZGB además de explotaciones mixtas vacuno/bufalino se presentaron fincas con sistema de explotación vacuno/bufalino/ovino (*B. taurus/B. bubalis/Ovis aries*) y vacuno/bufalino/ovino/porcino (*B. taurus/B. bubalis/O. aries/Sus scroffa domesticus*).

La predicción de microorganismos bacterianos se contabilizó en n=19, de las cuales 9 (47,4 %) han sido referidas como potenciales patógenos, mientras que las tres comunidades parasitarias reportadas han sido referidas como patógenas (TABLA IV).

TABLA IV

PREDICCIÓN MICROBIANA CON POTENCIAL PATÓGENO REPORTADO EN METAGENOMA SANGUÍNEO DE BOVINOS

Blast-NCBI / OTU's-DGGE	Frecuencia		Frecuencia	
	ZGA	%	ZGB	%
Diversidad bacteriana				
<i>Anaplasma marginale</i> <sup>(97)</sup>	31	45,6	14	22,9
<i>Mycoplasma wenyonii</i> <sup>(99)</sup>	15	22,1	12	19,7
<i>Ureaplasma urealyticum</i> <sup>(100)</sup>	12	17,6	10	16,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>(99)</sup>	2	2,9	9	14,8
<i>Mycoplasma haemolamae</i> <sup>(98)</sup>	1	1,5	4	6,5
<i>Brucella melitensis</i> <sup>(88)</sup>	-	-	2	3,3
<i>Acinetobacter</i> spp. <sup>(99)</sup>	6	8,8	7	11,5
<i>Propionibacterium</i> spp. <sup>(89)</sup>	-	-	3	4,9
<i>Corynebacterium</i> spp. <sup>(98)</sup>	1	1,5	-	-
Totales	68	100	61	100
Diversidad parasitaria				
<i>Besnoitia besnoiti</i> <sup>(99)</sup>	23	88,5	28	77,8
<i>Besnoitia jellisoni</i> <sup>(98)</sup>	-	-	8	22,2
<i>Babesia bovis</i> <sup>(99)</sup>	3	11,5	-	-
Totales	26	100	36	100

(<sup>1</sup>) % similitud

En *B. bubalis*, la máxima identidad por metagenoma incluyó: *Besnoitia besnoiti*, *Anaplasma marginale*, *Mycoplasma wenyonii*, *Acinetobacter* spp., *Brucella melitensis* y *Ureaplasma urealyticum*; y en *B. taurus* estuvo representada por: *A. marginale*, *M. wenyonii*, *Arthobacter* spp., *Azotobacter vinelandi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *U. urealyticum*. Los hallazgos de

identidad múltiple por metagenoma revelaron predicción de comunidades bacterianas sin potencial patógeno (TABLA V). Adicional, se reportó un 4,3 % (7/162) de bacterias no cultivables y un 9,9 % (16/162) de bandas OTU's sin similitud (ausencia de reporte en la base de datos del Blast-NCBI para esa secuencia).

TABLA V  
**PREDICCIÓN BACTERIANA SIN POTENCIAL PATÓGENO EN METAGENOMA SANGUÍNEO DE BOVINOS**

Blast-NCBI / OTU's-DGGE	Frecuencia			
	ZGA	%	ZGB	%
<i>Azotobacter vinelandi</i> <sup>(93)</sup>	8	53,3	7	29,2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <sup>(91)</sup>	2	13,3	2	8,3
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> <sup>(100)</sup>	-	-	3	12,5
<i>Acinetobacter johnsonii</i> <sup>(99)</sup>	1	6,7	1	4,2
<i>Brevundimonas subvibrioides</i> <sup>(100)</sup>	1	6,7	1	4,2
<i>Veillonella parvula</i> <sup>(98)</sup>	-	-	1	4,2
<i>Arthrobacter</i> spp. <sup>(91)</sup>	2	13,3	5	20,8
<i>Bacterium</i> spp. <sup>(85)</sup>	-	-	2	8,3
<i>Sphingomonas</i> spp. <sup>(98)</sup>	-	-	2	8,3
<i>Methylobacterium</i> spp. <sup>(100)</sup>	1	6,7	-	-
Totales	15	100	24	100

(<sup>1</sup>) % similitud

En comparación a los procedimientos de frotis sanguíneo coloreado, microcentrifugación y la técnica PCR que también fueron ejecutados, el sistema PCR/DGGE arrojó negatividad en la predicción de especies del género *Trypanosoma* así como baja frecuencia para *A. marginale* y *B. bovis* (datos no mostrados).

La tecnología PCR/DGGE en el campo veterinario comenzó a ser aplicada para la diferenciación taxonómica en grupos parasitarios como *Eimeria* y *Cryptosporidium* así como para algunos protozoarios de vida libre [5, 34]. Al presente, ha sido ensayada para determinar la complejidad bacteriana en diversos modelos animales a partir de muestras de rumen [9, 21, 27, 42, 43, 52], contenido estomacal, ileocecal o de heces [1, 24, 41, 55, 56], cavidad uterina [47], tracto respiratorio [40] y mucosas corporales como vaginal, ocular y nasal [48]. En cuanto a la determinación de microorganismos parasitarios, se citan las experiencias en rumen para bovinos y ovejos [26, 44, 49, 51] y contenido ileocecal de aves [53]. La utilización de esta herramienta biotecnológica de diversidad microbiana a partir del metagenoma obtenido de sangre de bovinos, permitió evidenciar hemotrópicos no considerados tradicionales en la ganadería bovina nacional, tal es el caso de especies pertenecientes a los géneros *Mycoplasma* y *Besnoitia*, así como hacer manifiesta la detección de otros patógenos cuando realizan tránsito hemático

(*B. melitensis*, *U. urealyticum*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Propionibacterium* spp. y *Corynebacterium* spp.).

*M. wenyonii* ha sido descrito en bovinos como agente etiológico de un síndrome anemizante caracterizado por linfadenopatías, pirexia y repercusión en sistemas cardíaco y reproductor, además de afectación en la producción lechera. A pesar de que ha sido incriminada la transmisión mecánica por *Stomoxys*, *Tabanus*, *Culex* y *Haematobia* y experimentalmente comprobada la transmisión transplacentaria, aún son desconocidos aspectos como prevalencias y rutas de transmisión. El diagnóstico directo de *M. wenyonii* puede presentar confusión con *A. marginale* y *Ehrlichia* [23, 31, 36], de tal modo que los procedimientos moleculares como el sistema PCR/DGGE resultan de confiabilidad en la detección de este agente.

*B. besnoiti* presenta a bóvidos domésticos y silvestres como hospedadores intermediarios. Es responsable de la besnoitiosis bovina, enfermedad considerada re-emergente y clínicamente caracterizada por la sucesión de tres fases, las dos primeras asociadas a la proliferación de endozoitos en vasos sanguíneos con signos como cuadro febril, anorexia, fotofobia, aumento de secreción nasal/ocular, incremento de la frecuencia cardiorrespiratoria, edema generalizado y adenopatías. Al presente, el ciclo de vida no está totalmente

comprendido por desconocimientos del hospedador definitivo y rutas de transmisión, aunque es posible la transmisión mecánica por *Stomoxys calcitrans* (ADN parasitario ha sido detectado en piezas bucales y contenido estomacal del vector). *B. besnoiti* se reporta como responsable de brotes al noreste de Europa y en países como Portugal, España y Francia [3, 25, 29, 30] y a pesar de no existir reportes vigentes de bovinos con infección activa en Suramérica [29], pudiera suponerse que su expansión a esta área, incluyendo Venezuela es posible. En la ganadería bovina nacional, *B. besnoiti* fue mencionado por vez primera por Vogelsang y Gallo [54], sin embargo hasta donde fue posible indagar, no se encontró referencia actualizada de su presencia, situación que pone de manifiesto su carácter re-emergente.

*U. urealyticum* se relaciona a un amplio espectro de enfermedades, algunas asociadas al sistema reproductivo del bovino, de tal modo que es importante un diagnóstico oportuno a fin de iniciar una terapia que prevenga las complicaciones y secuelas de la infección [8, 28]. *B. melitensis* ha sido señalada como responsable de abortos en pequeños animales principalmente cabras (*Capra hircus*) y ovejos, sus hospedadores primarios naturales [13] y su detección en bovinos pudo ser consecuencia de la circulación del microorganismo en ganaderías mixtas.

*P. aeruginosa* y los géneros *Acinetobacter*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium* están asociados a mastitis [32]. El género *Acinetobacter* se reporta en procesos de mastitis bovina multiresistente y formación de *biofilms* dentro del canal del pezón o equipos de ordeño, complicando más su tratamiento y prevención, por lo cual su temprana detección ayudaría a mejorar las maniobras de prevención y los abordajes de tratamientos [45].

El sistema PCR/DGGE ofrece ventajas frente a técnicas convencionales como la independencia de cultivo, el realizar un seguimiento temporal/espacial de comunidades microbianas en diferentes ambientes y la oportunidad de detectar infecciones inaparentes. Sin embargo, al igual que cualquier técnica analítica presenta inconvenientes [16, 35, 38, 45] como la co-migración y la obtención de bandas de baja intensidad que limitan el proceso de secuenciación y por ende, la capacidad de identificación [45]. Estos inconvenientes pudieran explicar la no correlación del sistema con técnicas como la PCR o procedimientos directos (datos no revelados).

Las repercusiones negativas en la producción animal de algunos microorganismos reportados en esta investigación, cuando se manifiestan como infecciones inaparentes, generalmente son observadas a largo plazo (calidad y cantidad de los productos obtenidos). La actual crisis económica en Venezuela sorprende a la nación en un momento en el que todas las razas ganaderas, inclusive los animales que gozan de buena condición genética están bajo riesgo de infección microbiana. Aunado, la escasa documentación en la literatura nacional para algunos de los microorganismos reportados en este estudio promueven el pensamiento sobre la circulación inaparente que puede ser extrapolada a las explotaciones ganaderas del

resto del país, creando escenarios alarmantes si se considera la posibilidad de que un animal subclínico pudiera aflorar condición clínica patente.

## CONCLUSIONES

Microorganismos de interés bovino se predicen en sistemas ganaderos de zonas de vida complejas del estado Mérida, Venezuela, señalando la ventaja diagnóstica de la metodología molecular en la comprensión epizootológica y el riesgo latente en animales inaparentes al considerar los factores socio-económicos-políticos actuales que impactan en la productividad ganadera.

Se considera necesario a nivel de campo, la utilización en conjunto de la metodología PCR/DGGE a otro procedimiento diagnóstico, así como proseguir con las investigaciones empleando la metodología propuesta a un mayor número de animales.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de Los Andes (CDCHTA-ULA) bajo el Proyecto: FA-582-15-03-B, por el financiamiento otorgado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AL-SOUD, W.; BENNEDSEN, M.; ON, S.; OUIS, I.; VANDAMME, P.; NILSSON, A.; LJUNGH, A.; WADSTRÖM, T. Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. **J. Med. Microbiol.** 52:765-771. 2003.
- [2] AGUIRRE, V.; ALVARADO, M.; IBAVE, J.; LEAL, M.; DÍAZ, E.; NEVÁREZ, G.; SOLÍS, F.; ARÉVALO, S.; RIVERA, B. Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble. **Téc. Pec. Méx.** 46(2):147-158. 2008.
- [3] BALDACCHINO, F.; MUENWORN, V.; DESQUESNES, M.; DESOLI, F.; CHAROENVIRIYAPHAP, T.; DUVALLET, G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. **Parasite.** 20(26):1-13. 2013.
- [4] BARÉ, J.; HOUF, K.; VERSTRAETE, T.; VAEREWIJK, M.; SABBE, K. Persistence of free-living protozoan communities across rearing cycles in commercial poultry houses. **Appl. Environ. Microbiol.** 77(5):1763-1769. 2011.
- [5] BARÉ, J.; SABBE, K.; VAN WICHELEN, J.; VAN GREMBERGHE, I.; D'HONDT, S.; HOUF, K. Diversity and habitat specificity of free-living protozoa in commercial poultry houses. **Appl. Environ. Microbiol.** 75(5):1417-1426. 2009.

- [6] BOLÍVAR, A.M.; ROJAS, A.; ROSALES, D.; TORRES, Y.; GARCÍA-LUGO, P. Detección de agentes hemotrópicos en una explotación ganadera utilizando PCR y DGGE. **Rev. Salud Anim.** 36(1):53-57. 2014.
- [7] CAMINERO, A. Estudio de la actividad metabólica de la microbiota intestinal asociada al consumo de gluten en humanos. Departamento de Biología Molecular. Universidad de León. España. Tesis de Grado. 227 pp. 2013.
- [8] CENTRO DIAGNÓSTICO VETERINARIO S.A. (CDV) Boletín Técnico electrónico N°9. Septiembre. Argentina. Conde. Pp 1-6. 2012.
- [9] CHEN, Y.; PENNER, G.; LI, M.; OBA, M.; GUAN, L. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet. **Appl. Environ. Microbiol.** 77(16):1-12. 2011.
- [10] CORDERO, M. Importancia económica y sanitaria de las parasitosis. En: **Parasitología Veterinaria**. Editorial McGraw-Hill, Interamericana de España. Madrid. 3ra. Reimpr. Pp 178-181. 2002.
- [11] COSTA, V.; RIBEIRO, M.; DUARTE, A.; MANGUEIRA, J.; PESSOA, A.; AZEVEDO, S.; MEDEIROS, A.; RIET-CORREA, F.; LABRUNA, M. Seroprevalence and risk factors for cattle anaplasmosis, babesiosis and trypanosomiasis in a Brazilian semiarid region. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** 22(2):207-213. 2013.
- [12] DENG, W.; XI, D.; MAO, H.; WANAPAT, M. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. **Mol. Biol. Rep.** 35:265-274. 2008.
- [13] DÍAZ, E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** 32(1):53-60. 2013.
- [14] DÍEZ, B.; PEDRÓS-ALIÓ, C.; MARSH, T.; MASSANA, R. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(7):2942-2951. 2001.
- [15] DUMLER, S.; BARBET, A.; BEKKER, C.; DASCH, G.; PALMER, G.; RAY, S.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 51:2145-2165. 2001.
- [16] FERNÁNDEZ, S. Utilización de la DGGE para la caracterización de la microbiota asociada a la manzana de sidra. Universidad de Oviedo. España. Tesis de Grado. 60 pp. 2013.
- [17] FISCHER, S.; LERMAN, L. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. **Cell.** 16(1):191-200. 1979.
- [18] FISCHER, S.; LERMAN, L. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80:1579-1583. 1983.
- [19] GARCÍA, A. Evaluación del sistema de agua de circulación de una central nuclear mediante técnicas de microbiología molecular. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales. España. Tesis de Grado. 258 pp. 2004.
- [20] GÓMEZ-PIÑERES, E.; BOADA-SUCRE, A.; BRETaña, A.; CONTRERAS-BRETaña, M.; GARCÍA, F.; REYNABELLO, A. Morfometría comparativa de cinco aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. **Rev. Fac. Cs. Vets. UCV.** 55(1):25-33. 2014.
- [21] HERNANDEZ, E.; GOONEWARDENE, L.; WANG, Z.; DURUNNA, O.; MOORE, S.; GUAN, L. Impact of feed efficiency and diet on adaptive variations in the bacterial community in the rumen fluid of cattle. **Appl. Environ. Microbiol.** 78(4):1203-1214. 2012.
- [22] HORNOK, S.; MICSUTKA, A.; FERNÁNDEZ, I.; MELI, M.; GÖNCZI, E.; TÁNCZOS, B.; MANGOLD, A.; FARKAS, R.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DE LA FUENTE, J. Fatal bovine anaplasmosis in a herd with new genotypes of *Anaplasma marginale*, *Anaplasma ovis* and concurrent haemoplasmosis. **Res. Vet. Sci.** 92:30-35. 2012.
- [23] HORNOK, S.; MICSUTKA, A.; MELI, M.; LUTZ, H.; HOFMANN, R. Molecular investigation of transplacental and vector-borne transmission of bovine haemoplasmas. **Vet. Microbiol.** 152:411-414. 2011.
- [24] HUME, M.; BARBOSA, N.; DOWD, S.; SAKOMURA, N.; NALIAN, A.; MARTYNOVA, A.; OVIEDO, E. Use of pyrosequencing and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis to examine the effects of probiotics and essential oil blends on digestive microflora in broilers under mixed *Eimeria* infection. **Food-borne Pathog. Dis.** 8(11):1159-1167. 2011.
- [25] JACQUIET, P.; LIÉRNAD, E.; FRANK, M. Bovine besnoitiosis: epidemiological and clinical aspects. **Vet. Parasitol.** 24:174(1-2):30-6. 2010.
- [26] KARNAKI, S.; YU, Z.; SYLVESTER, J.; DEHORITY, B.; MORRISON, M.; FIRKINS, J. Technical note: specific PCR amplification of protozoal 18S rDNA sequences from DNA extracted from ruminal samples of cows. **J. Anim. Sci.** 81:812-815. 2003.

- [27] KOCHERGINSKAYA, S.; AMINOV, R.; WHITE, B. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. **Anaerobe**. 7:119-134. 2001.
- [28] KOKKAYIL, P.; DHAWAN, B. *Ureaplasma*: Current perspectives. **Indian J. Med. Microbiol.** 33(2):205-214. 2015.
- [29] LAVERDE, L.; BENAVIDES, B. ¿Bovine besnoitiosis: present in Colombia? **Rev. Lasallista Investig.** 8(2):154-162. 2011.
- [30] LIÉRNAD, E.; SALEM, A.; JACQUIET, P.; GRISEZ, C. Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystiade). **Parasitol. Res.** 112:479-486. 2013.
- [31] MAGGI, R.; COLTER, M.; KENNEDY, S.; DEPERNO, C. Novel hemotropic *Mycoplasma* species in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** 36(6):607-611. 2013.
- [32] MARTÍNEZ, D.; CRUZ, A.; MORENO, G. Resistencia de las bacterias causantes de mastitis bovina frente a los antimicrobianos más frecuentes. **Conex. Agrop. JDC.** 3(1):53-73. 2013.
- [33] MARTÍNEZ, E.; JACOBO, R.; MARTÍNEZ, D.; CIPOLINI, M.; STORANI, C. Diagnóstico clínico de anaplasmosis en búfalos. Datos parciales. Comunicaciones científicas y tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Secretaria General de Ciencia y Técnica. México. 3 pp. 2009.
- [34] MARTYNOVA, A.; SYVYK, A.; TEPLOVA, I.; HUME, M.; NALIAN, A. Rapid detection of avian *Eimeria* species using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Poultry. Sci.** 87:1707-1713. 2008.
- [35] MARSCHER, P. Soil microbial community structure and function assessed by FAME, PLFA and DGGE - advantages and limitations. In: **Advanced Techniques in Soil Microbiology**. Springer Berlin Heidelberg. Pp 181-200. 2007.
- [36] MCAULIFFE, L.; LAWES, J.; BELL, S.; BARLOWB, A.; AYLING, R.; NICHOLAS, R. The detection of *Mycoplasma* (formerly Eperythrozoon) *wenyonii* by 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Vet. Microb.** 117:292-296. 2006.
- [37] MUYZER, G.; DE WAAL, E.; UITIERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified genes coding for 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 59(3):695-700. 1993.
- [38] MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**. 73:127-141. 1998.
- [39] OLIAS, P.; SCHADE, B.; MEHLHORN, H. Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). **Infect. Genet. Evol.** 11(7):1564-1576. 2011.
- [40] PETERSEN, R.; HARRINGTON, C.; KORTEGAARD, H.; ON, S. A PCR-DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related Epsilonbacteria and its application to saliva samples from humans and domestic pets. **J. Appl. Microbiol.** 103:2601-2615. 2007.
- [41] PETERSSON, A.; DOMIG, K.; NAGEL, P.; ZOLLITSCH, W.; HAGMÜLLER, W.; KNEIFELD, W. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)-based monitoring of intestinal lactobacilli and bifidobacteria of pigs during a feeding trial. **Arch. Anim. Nutr.** 63(2):112-126. 2009.
- [42] PETRI, R.; SCHWAIGER, T.; PENNER, G.; BEAUCHEMIN, K.; FORSTER, R.; MCKINNON, J.; MCALLISTER, T. Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge. **Plos. One**. 8(12): 1-15(a). 2013.
- [43] PETRI, R.; SCHWAIGER, T.; PENNER, G.; BEAUCHEMIN, K.; FORSTER, R.; MCKINNON, J.; MCALLISTER, T. Changes in the rumen epimural bacterial diversity of beef cattle as affected by diet and induced ruminal acidosis. **Appl. Environ. Microbiol.** 79(12):1-12(b). 2013.
- [44] REGENSBOGENOVA, M.; PRISTAS, P.; JAVORSKY, P.; DER, M.; STAAY, S.; STAAY, V.; HACKSTEIN, J.; NEWBOLD, C.; MCEWAN, N. Assessment of ciliates in the sheep rumen by DGGE. **Lett. Appl. Microbiol.** 39:144-147. 2004.
- [45] ROSALES, D.; TORRES, Y.; ROJAS, A.; BOLÍVAR, A.; ROSALES, J.; ALVIAREZ, E.; GARCÍA-LUGO, P. Identificación bacteriana empleando PCR-DGGE en leche de vacas con mastitis de un rebaño mestizo Gyr-Holstein del Municipio Obispo Ramos de Lora, Mérida-Venezuela. **Ágoras de Heterodox**. 1:92-103. 2015.
- [46] RUIZ, A.; PONCE, P.; GOMES, G.; MOTA, R.; SAMPAIO, E.; LUCENA, E.; BENONE, S. Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. **Rev. Salud Anim.** 33(1): 57-64. 2011.
- [47] SANTOS, T.; BICALHO, R. Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. **Plos. One**. 7(12):1-10. 2012.

- [48] SCHNEE, C.; SCHULSSE, S.; HOTZEL, H.; AYLING, R.; NICHOLAS, R.; SCHUBERT, E.; HELLER, M.; EHRLICH, R.; SACHSE, K. Novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 *Mycoplasma* species and highlights multiple *Mycoplasma* infections. **Plos. One.** 7(3):1-10. 2012.
- [49] SHIN, E.; CHO, K.; LIM, W.; HONG, S.; AN, C.; KIM, E.; KIM, Y.; CHOI, B.; AN, J.; KANG, J.; KIM, H.; YUN, H. Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. **J. Appl. Microbiol.** 97:378-383. 2004.
- [50] SIQUEIRA, J.; SAKAMOTO, M.; ROSADO, A. Microbial community profiling using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). In: G.J. Seymour et al. (eds.), Oral Biology. **Methods Mol. Biol.** 71-85. 2010.
- [51] THEELEN, B.; SILVESTRI, M.; GUÉHO, E.; VAN BELKUM, A.; BOEKHOUT, T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLPTm), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **FEMS. Yeast. Res.** 79-86. 2001.
- [52] UEDA, K.; OHNO, M.; YAMAMOTO, K.; NARA, H.; MORI, Y.; SHIMADA, M.; HAYASHI, M.; OIDA, H.; TERASHIMA, Y.; NAGATA, M. Distribution and diversity of symbiotic thermophiles *Symbiobacterium thermophilum* and related bacteria, in natural environments. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(9):3779-3784. 2001.
- [53] VANKLEY, M.; SYVYK, A.; TEPLOVA, I.; HUME, M.; NALIAN, A. Rapid detection of avian *Eimeria* species using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Poult. Sci.** 87:1707-1713. 2008.
- [54] VOGELSANG, E.; GALLO, P. *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) y habronemosis cutánea en bovinos de Venezuela. **Rev. Med. Vet. Parasitol.** Caracas. 3:153-155. 1941.
- [55] WALTER, J.; TANNOCK, G.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; LOACH, D.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and species-specific PCR primers. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(1):297-303. 2000.
- [56] WALTERS, S.; DUFFY, C.; POWER, R. PCR-DGGE Analysis of caecal microflora of natostat TM-supplemented turkeys challenged with *Histomonas meleagridis*. **Int. J. Poult. Sci.** 4(9):620-627. 2005.