

**Prevalencia de *Streptococcus equi* en el municipio de Caldas-Antioquia en 2016**

**Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario**

**Humberto González Díaz**

**Asesor**

**Camilo Jaramillo Morales MV**

**Magíster en Medicina Veterinaria Equina**

**Corporación Universitaria Lasallista**

**Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias**

**Medicina Veterinaria**

**Caldas-Antioquia**

**2017**

## Tabla de contenido

Introducción-----	8
Justificación-----	10
Objetivos-----	12
Objetivo principal-----	12
Objetivos específicos-----	12
Marco teórico-----	13
Signos clínicos-----	15
Diagnóstico-----	16
Cultivo-----	16
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)-----	16
Metodología-----	18
Consideraciones éticas-----	18
Tipo de estudio-----	18
Población y muestra-----	18
Criterios de selección y admisión-----	19
Diseño muestral-----	19
Proceso de obtención de la información-----	20
Protocolo de extracción de ADN-----	21
Protocolo de electroforesis-----	22
Preparación de TBE 1X:-----	22

Preparación de gel de Agarosa 2%: -----	22
Montaje de cámara de electroforesis: -----	23
Protocolo de PCR -----	24
Hidratación Primers -----	24
SodA-d1 -----	24
SodA-d2 -----	24
Preparación de los dNTPs -----	25
Preparación del MIX -----	25
Calibración el Termociclador -----	26
SodA-d1 y SodA-d2 -----	26
Análisis de los datos -----	27
Resultados -----	28
Discusión -----	30
Conclusiones y recomendaciones -----	31
Referencias -----	32
Apéndices -----	36

## Lista de tablas

Tabla 1: Relación de los equinos con la presentación de signos clínicos compatibles a los presentados en la infección por <i>Streptococcus equi</i> , características del cultivo, extracción de ADN y PCR positiva. ....	29
---	----

## Lista de gráficas

Gráfica 1: Pares de bases del primer SodA .....	26
Gráfica 2: Gel de electroforesis con Primer Soda, el número 2 y 19 presentan 2 muestras debido a la formación en el cultivo de dos colonias diferentes que realizaban $\beta$ -hemolisis .....	28

## Lista de apéndices

Apéndice A. Procedimiento de la endoscopia .....	36
Apéndice B. Cultivo en agar sangre .....	40
Apéndice C. Procedimiento de PCR .....	40

## Resumen

**Introducción:** El *Streptococcus equi*, es una bacteria de distribución mundial, muy variable y extremadamente contagiosa, que causa infección en las vías respiratorias altas en caballos y humanos; en los animales jóvenes puede producir gurma bastarda y terminar con una purpura hemorrágica conduciendo a la muerte del paciente; este microorganismo es capaz de permanecer en el equino de por vida, causando grandes pérdidas económicas. **Objetivo:** Determinar la prevalencia de *Streptococcus equi* en la población equina del municipio de Caldas en el departamento de Antioquia en el 2016. **Materiales y métodos:** Se tomaron 126 equinos como muestra para el diagnóstico de *Streptococcus equi*, para lo cual se realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), de muestras de hisopados de bolsas guturales tomadas con la ayuda de un endoscopio posterior a la realización de cultivo y purificación. **Resultados:** Se encontró una prevalencia del 15% en la población equina de *Streptococcus equi*. **Conclusiones:** Con la prevalencia obtenida del 15% se evidenció la presencia de *Streptococcus equi* en los equinos de Caldas Antioquía y Colombia por primera vez, por lo cual es de vital importancia un adecuado diagnóstico.

**Palabras claves:** bolsas guturales, empiema, equino, linfadenopatía, PCR.

## Introducción

El *Streptococcus equi*, es una bacteria de distribución mundial, muy variable, y extremadamente contagiosa, causante de infecciones de vías respiratorias altas en caballos y humanos, la cual cursa inicialmente con depresión, progresando a episodios febriles con secreción nasal y culminando con una vasculitis inmunomediada, llevando a la muerte del paciente, considerándolo así causal de grandes pérdidas a la industria equina en todo el mundo (Waller, 2014). Es un agente zoonótico y corresponde a un riesgo para la Salud Pública (Pelkonen, Lindahl, Suomala, Karhukorpi, Vuorinen, Koivula, Vaisanen, Pentikainen, Autio & Tuuminen, 2013).

Dentro del gremio veterinario colombiano, esta enfermedad se diagnóstica en su gran mayoría por los signos clínicos presentados por el caballo y no por identificación de la bacteria con ayudas de laboratorio (Cultivo bacteriano y/o PCR); por lo cual sólo se lleva a cabo un diagnóstico de trabajo y no el diagnóstico definitivo (Arias, 2013). En estudios previamente realizados en EEUU, un alto porcentaje de los equinos evaluados son portadores asintomáticos y hacen que la enfermedad se mantenga latente (Waller, 2014). En Colombia no se había descrito previamente la presencia del *S. equi*, así como tampoco su prevalencia.

Al haber determinado la prevalencia de esta enfermedad se podrán encaminar tratamientos eficaces para la eliminación del microorganismo y así evitar la propagación de nuevos casos que culminarán en la posible aparición de portadores asintomáticos (Mallicote, 2015), por lo cual, este trabajo aporta al conocimiento de la epidemiología de la enfermedad para establecer planes adecuados de bioseguridad y



contribuir a la prevención de la misma, logrando con esto disminuir la presentación de la afección y así mejorar las condiciones que pudiesen llegar a afectar las vías respiratorias de los equinos de Colombia.

## Justificación

El municipio de Caldas se encuentra al sur del Valle de Aburrá en el departamento de Antioquia, conocido por su cultura equina. De la población de equinos, mulares y asnales que se calcula en Colombia en 1'559,216 ejemplares, el 9% de esos animales se encuentran en Antioquia, según datos obtenidos en el último censo pecuario realizado en 2015 por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), en Caldas se calcula una población de 1,961 ejemplares, ubicados en 156 pesebreras registradas según datos obtenidos en la Secretaria de Agricultura del Municipio. Caldas lleva varios años presentando casos de infecciones respiratorias bacterianas compatibles sinológicamente con la enfermedad causada por *Streptococcus equi*, la más frecuente mundialmente (Arias, 2013); basados en esa presunción clínica los veterinarios de campo tratan estas enfermedades basados sólo en sinología clínica, lo que en muchas ocasiones conduce a una recidiva la enfermedad al presentarse cada vez más resistencia antibiótica (Waller, 2014). A pesar del municipio de Caldas ser un centro de comercio de equinos importante, no se habían realizado estudios para determinar la presencia de *Streptococcus equi*, ni la prevalencia de este.

Utilizando técnicas de laboratorio como cultivo bacteriano, antibiograma y PCR se podrá determinar la presencia de *S.equi*, e igualmente desarrollar planes terapéuticos idóneos. De esta manera si los caballos se mantienen sanos, las pérdidas económicas de los criaderos se disminuye, como así el riesgo de contraer *Streptococcus equi* por parte de personas involucradas con el sector, contribuyendo

además de esta manera a mejorar las condiciones de salud pública (Arias, 2013; Poulin & Boivin, 2009).

## Objetivos

### Objetivo principal

Determinar la prevalencia de *Streptococcus equi* en la población equina del municipio de Caldas en el departamento de Antioquia en el 2016.

### Objetivos específicos

Identificar por PCR la presencia de *Streptococcus equi* en las muestras colectadas de bolsas gutrales.

Determinar la proporción de portadores asintomáticos del *Streptococcus equi*.

## Marco teórico

El *Streptococcus* sp. es causante de infecciones de vías respiratoria altas junto a linfadenitis, infecciones de las vías respiratorias de los recién nacidos e infecciones septicémicas en potros. Es un habitante residente de las mucosas de las vías respiratorias altas, del tracto genital inferior y de una gran parte del tracto digestivo (*S. equi sub zooepidemicus*), por lo que muchas de las infecciones son oportunistas (Reed, Bayly & Sellon, 2009; Arias, 2013).

Son cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, catalasa negativos,  $\beta$ -hemolíticos y no esporulan, pueden medir aproximadamente una micra, es susceptible a la desecación y puede causar lesiones piógenas. Los *S.pyogenes* y *S.equi* tienen una capa formada de ácido hialurónico no antigénico (Moraes, Silva, Vargas, Nogueira, Leite & Gil-Turnes, 2009).

Tanto el *S.equi* y *S.zooepidemicus* son  $\beta$ -hemolíticos esto determinara que se dé la destrucción de los eritrocitos y producir halos de claridad transparente alrededor de sus colonias (Holden, Heather, Paillot, Steward, Webb, Ainslie, Jourdan, Bason, Holroyd, Mungall, Quail, Sanders, Simmonds, Willey, Brooks, Aanensen, Spratt, Jolley, Maiden, Kehoe, Chanter, Bentley, Robinson, Maskell, Parkhill & Waller, 2009).

El *Streptococcus* tiene una necesidad de crecimiento muy exigente por lo que sería recomendado cultivarlos en agar sangre, agar selectivo de sangre y agar MacConkey; tras su incubación a 37 grados centígrados durante 24-48 horas, los *Streptococcus* sp forman colonias transparentes, generalmente de 1 cm, pero las

capsuladas como *S.equi* forma colonias de mayor tamaño y aspecto mucoide (Durham, 2014).

Los  $\beta$ -hemolíticos tienen la capacidad de sobrevivir durante semanas en el pus seco, aunque son susceptibles a temperaturas altas entre 55 y 60 grados centígrados.

Los *Streptococcus* patógenos como *S.equi* y *S.zooepidemicus* son sensibles a las penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, cloranfenicol y a las sulfas, y con frecuencia resistente a las tetraciclinas y aminoglucocidos (McClure, Sibert, Hallberg & Bade, 2011).

Por lo general los *Streptococcus* son transmitidos por inhalación o por ingestión, transmisión sexual, o indirectamente por manos o fómites (Reuss & Giguère, 2015).

*Streptococcus equi sub equi* causa adenitis, infecciones mastíticas y genitales en caballos, también se asocia a onfaloflebitis supurativa en potros. La supervivencia de *S. equi sub equi* fuera del hospedero es limitada, quizás dos meses en condiciones óptimas (Freeman, 2015).

Los portadores asintomáticos son raros, la mayor fuente de infección se da por caballos enfermos que liberan el organismo por descargas nasales o abscesos supurantes; los cuales son responsables de la infección en el hato. El periodo de incubación es corto, de 3 días a 2 semanas (Freeman, 2015).

En estudios previos se ha determinado una prevalencia del 10% en EEUU (Waller, 2014), 90% en Irlanda (Moloney, et al. 2013), 9,5% en Israel (Tirosh-Levy, et al. 2016), y del 2,3% en Brasil (Libardoni, et al. 2016).

## Signos clínicos

Dentro de los signos característicos, la fiebre es el primero en manifestarse, seguido de un aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos ubicados en la cabeza (sub mandibular) y cuello (retro faríngeos), los cuales manifiestan dolor a la palpación. Los nódulos linfáticos sub mandibulares pueden madurar hasta romperse y presentar una descarga purulenta 7 a 10 días post-infección. La faringitis secundaria causada por estos abscesos es muy dolorosa generando una disfagia, al tener dificultad para tragar el paciente deja de consumir alimento y agua, agravando el cuadro. Se puede observar al caballo con el cuello extendido. Depresión y letargia son signos característicos. Faringitis, laringitis y rinitis, contribuyen a la aparición de una descarga bilateral por los ollares, inicialmente serosa pero rápidamente pasa a ser purulenta. La acumulación de pus en las vías aéreas cursa con estridor y tos húmeda. Las mucosas ocular y nasal se encuentran hiperémicas. La maduración del nódulo linfático retro faríngeo produce empiema en las bolsas guturales. Puede haber muerte por complicaciones como neumonía, compromiso neurológico, asfixia por la presión en la faringe por el agrandamiento de los nódulos linfáticos y purpura hemorrágica (Reed, Bayly & Sellon, 2009; Arias, 2013).

*S. equi subsp zooepidemicus* también cursa con problemas respiratorios, pero estos no son de tan alta magnitud, siendo mas comunes afecciones a nivel genital (glándula mamaria). Por lo cual es importante tenerlo presente para un adecuado diagnostico (Pisoni, Zadoks, Vimercati, Locatelli, Zanoni & Moroni, 2009).

## Diagnóstico

### Cultivo

El cultivo de hisopados nasales, lavados nasales o aspirados del pus de los abscesos eran la prueba de oro para la detección del *Streptococcus equi var equi*, aunque la presencia de *Streptococcus equi var zooepidermicus* puede complicar la interpretación del cultivo. El lavado nasal, puede ser mejor que el hisopado para detectar mayores cantidades de *Streptococcus equi*, ya que, tiene mayor área de superficie (Freeman, 2015).

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR, está diseñada para detectar secuencia de ADN de la SeM, el gen para la proteína M antifagocítica de *Streptococcus equi var equi*, el cual es un gen muy conservado (Ma, Zhang, Zheng, Li, Yi, 2012). La identificación por PCR es rápida, inclusive se pueden obtener resultados en un día, sin embargo la prueba no diferencia organismos vivos de muertos, por lo que se debe confirmar el diagnóstico por cultivo. Aunque la PCR es capaz de detectar el ADN SeM del *Streptococcus equi var equi* durante semanas en lavados de las bolsas gutrales siguientes a la desaparición del organismo (Holden, et al, 2009; Arias, 2013).

La detección de portadores asintomáticos se basa principalmente en la confirmación por endoscopia, pues al no presentar ningún signo característico, su diagnóstico será a causa de otros exámenes rutinarios.



Los equinos al estar expuestos al agente desarrollan un estado clínico, pero ante la persistencia y desconocimiento por parte de los propietarios, estos pasan de un estado clínico a un estado de ser asintomáticos, quedando con secuelas características que nos pueden guiar hacia el causante.

En los portadores asintomáticos se encontrarán lesiones, puntos de reparación o caseificación del pus alguna vez existente, ya ante la presencia de dichos se procede a una prueba de PCR, la cual nos confirmará que hay presencia del agente, pero no determinará si todavía está afectando el individuo o ya no (Webb, Barker, Harrison, Heather, Steward, Robinson, Newton & Waller, 2013), por lo que se recomienda cultivos seriados, realizando 3 hisopados de las bolsas gutrales durante 3 semanas. Esto nos dará el resultado final sobre la persistencia del agente (Lindahl, Baverud, Egenvall, Aspán y Pringle, 2013).

## **Metodología**

El enfoque metodológico del estudio es observacional descriptivo.

### **Consideraciones éticas**

Los investigadores se comprometieron a cumplir a cabalidad la Ley 84 de 1989 por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales. De igual forma, los investigadores y coinvestigadores, como médicos veterinarios en ejercicio y estudiantes de medicina veterinaria, se comprometieron a seguir los lineamientos de la Ley 576 de 2000, correspondiente al Código de Ética para el ejercicio profesional de dichas áreas. Además el proyecto se sometió al comité de ética para la experimentación con animales de la institución, siendo avalado por el acta número 14 del 16 de noviembre de 2015.

### **Tipo de estudio**

Es un estudio epidemiológico de prevalencia.

### **Población y muestra**

El municipio de Caldas Antioquia cuenta con una población equina de 1961 ejemplares, según datos obtenidos en el último censo pecuario realizado en 2015 por el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), registrados en 156 pesebreras; de éstos se muestrearon 126 caballos. El tamaño muestral se determinó con la siguiente fórmula epidemiológica y con ayuda del programa virtual Feedback Networks Technologies®. La prevalencia que se esperaba era del 10%, con un error 0.05 (Waller, 2014).

### **Criterios de selección y admisión**

Se seleccionaron todos los caballos mayores de 2 años, sanos o enfermos, posteriormente fueron admitidos en este estudio siendo escogidos por aleatorización simple por medio del software Microsoft Excel®. El estado de enfermedad no excluyó los caballos de este estudio debido a que la PCR es muy sensible y específica para el microorganismo (Walshe & Duggan, 2011).

### **Diseño muestral**

Los 126 equinos que se tuvieron en cuenta para determinar la prevalencia de *S. equi* se encuentran en criaderos ubicados en Caldas, Antioquia. Los caballos de cada criadero elegido fueron sometidos para su inclusión en el estudio a una aleatorización simple por medio del software Microsoft Excel.

El muestreo se realizó de manera estratificada por fijación proporcional al tamaño poblacional de cada criadero, posteriormente se realizó dentro de cada

criadero un muestreo aleatorio como ya se mencionó anteriormente para seleccionar los animales a muestrear que cumplieron con los criterios de selección, respetando la proporción de la muestra.

### **Proceso de obtención de la información**

Inicialmente se hizo firmar un consentimiento informado, Los caballos del estudio fueron sedados antes de la endoscopia. La sedación de los equinos se realizó con xilazina a una dosis de 0,5 mg/kg combinada con acepromazina a dosis de 0,02 mg/kg por vía intravenosa (Molina, 2016). Diez minutos después de la administración del sedante se inició el proceso ingresando primeramente por el ollar izquierdo, dirigiendo hacia el meato ventral un equipo de toma de citología uterina, hasta alcanzar la nasofaringe, por el otro ollar se ingresó el endoscopio recorriendo nuevamente el meato ventral hasta la nasofaringe, con una pinza de biopsia se abrió la plica guturofaringea izquierda para posteriormente ingresar el hisopo hasta la bolsa gutural y realizar el muestreo (descripción ilustrativa en apéndices) (Barakzai, 2007).

Luego se retiró el hisopo y de una manera rápida y evitando contaminación del ambiente por medio del uso de un mechero se introdujo cada muestra individualmente en un tubo ependor con medio PBS para transporte y posterior cultivo.

Las muestras fueron enviadas para ser cultivadas al laboratorio de Ciencias Biológicas sector microbiología de la Corporación Universitaria Lasallista, las muestras fueron cultivadas en agar sangre según los protocolos del laboratorio, posterior a su crecimiento se determinaron cuales muestras eran correspondientes a *Streptococcus*

*equi*, esto basado en las características de crecimiento en el agar (descripción ilustrativa en apéndices). A cada muestra de interés se le realizó purificación y una vez finalizado el procedimiento se realizaron dos nuevos cultivos por muestra, es decir uno en H<sub>2</sub>O libre y estéril para trabajo y una en Glicerol para preservación a -80°C. Las muestras en H<sub>2</sub>O fueron utilizadas para la realización de la extracción del ADN, cuantificación y PCR; para ello se siguieron los protocolos descritos para esta técnica según los diferentes kits de extracción de ADN y PCR convencional (descripción ilustrativa en apéndices). A continuación se detallan todos los protocolos utilizados:

#### **Protocolo de extracción de ADN**

1. Se descongelaron las muestras.
2. Se realizó vórtex a las muestras hasta homogeneizar.
3. Se sacaron 500 µl y se pasaron a un tubo de 1.5 ml de micro centrifuga.
4. Se centrifugaron a 7500 rpm por 10 minutos, descartando el sobrenadante.
5. Se suspendió el paquete bacteriano en 180 µl de T.E más 20 mg/ml de lysosima pura, se realizó vórtex.
6. Se incubaron por 30 minutos a 37°C (Bloque de calentamiento).
7. Se adicionaron 25 µl de Proteinasa K y 200 µl de buffer AL, se realizó vórtex.
8. Se incubaron por 30 minutos a 56°C (Bloque de calentamiento).
9. Se adicionaron 200 µl de etanol 96% a la muestra y se mezclaron a mano o vórtex suavemente (Madeja ADN).
10. Se tomaron 800 µl y se adicionaron al tubo Mini-spin de columnas de 2 ml.
11. Se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto, se eliminó lo lavado.

12. Se cambió el filtro a otro tubo nuevo de 2 ml y se adicionaron 500 µl de buffer AW1.

13. Se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto, eliminando el lavado.

14. Se cambió el filtro a otro tubo nuevo de 2 ml y se adicionaron 500 µl de buffer AW2.

15. Se centrifugaron a 14000 rpm por 3 minutos , eliminando el lavado.

16. Se pasó el filtro a un tubo de micro centrifuga de 1.5 ml y se adicionaron 100 µl de buffer AE, depositandolos sobre la membrana.

17. Se incubaron por 1 minuto a temperatura ambiente.

18. Se centrifugaron a 8000 rpm por 1 minuto.

19. Se eliminó el filtro y se guardó el lavado (ADN).

## **Protocolo de electroforesis**

### ***Preparación de TBE 1X:***

1. Se tomaron 1000 ml de agua deionizada.

2. Se pesaron 17 g de TBE granulado.

3. Se adicionó el TBE al 1L de H<sub>2</sub>O para obtener un TBE 1X.

### ***Preparación de gel de Agarosa 2%:***

1. Se tomaron 40 ml del TBE 1X.

2. Se pesaron 0,8 g de Agarosa.

3. Se adicionaron a los 40 ml de H<sub>2</sub>O.

4. Se llevó al horno microondas por un minuto (30 s -stop-, mezclar-reiniciar a los 20 s faltantes stop).
4. Se agitó el contenido.
5. Se dejó en reposo 3 minutos y se adicionaron 4  $\mu$ l de EZ-VISIN, se agitó y se dejó en reposo 4 minutos.
6. Se prepara la cámara con el peine y se depositó el gel lentamente.
7. Se dejó solidificar el gel 20 minutos.

***Montaje de cámara de electroforesis:***

1. Se retiró el peine del gel solidificado y se depositó el gel en la cámara.
2. Se depositaron 500 ml del TBE 1X (buffer de corrido) en la cámara.
3. Se prepararon las muestras a evaluar.
4. Se depositaron en los pozos hechos con papel parafilm 1  $\mu$ l de buffer de carga (6X)
5. Se mezclaron 3  $\mu$ l de marcador de peso molecular (MPM) en 1  $\mu$ l de 6X, se depositaron en el primer carril de los pozos (1er).
6. Se mezclaron 5  $\mu$ l de la muestra a evaluar (DNA) con 1  $\mu$ l de 6X y se depositó en el pozo número 2 y así sucesivamente con el resto de las muestras.
7. Luego de montar todas las muestras, se tapó la cámara y se encendió la fuente de poder programándola a 100V por 40 minutos.
8. Se inició el equipo (start) para empezar el corrido de la muestra.
9. Pasados los 40 minutos se hizo el revelado.

10. Se apagó la fuente de poder y se llevó el gel al foto documentador donde con luz UV se pudieron ver las bandas de cada muestra.

11. Se guardó la foto del revelador y se verificó posteriormente que las muestras se revelaran.

## **Protocolo de PCR**

### ***Hidratación Primers***

#### ***SodA-d1***

1. Se adicionaron 208,5  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O libre para llevar a una concentración de 100 pmoles/ $\mu\text{l}$ .

2. Se realizaron 2 alícuotas de 60  $\mu\text{l}$  del preparado anterior (100 pmoles/ $\mu\text{l}$ ).

3. Del tubo original (100 pmoles/ $\mu\text{l}$ ) se extrajeron 30  $\mu\text{l}$  y se adicionaron 270  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O libre, para llevar a una concentración de 10 pmoles/ $\mu\text{l}$ .

4. Se realizaron 3 alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  del preparado anterior (10 pmoles/ $\mu\text{l}$ ).

#### ***SodA-d2***

1. Se adicionaron 195,5  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O libre para llevar a una concentración de 100 pmoles/ $\mu\text{l}$ .

2. Se realizaron 2 alícuotas de 60  $\mu\text{l}$  del preparado anterior (100 pmoles/ $\mu\text{l}$ ).

3. Del tubo original (100 pmoles/ $\mu\text{l}$ ) se extrajeron 30  $\mu\text{l}$  y se adicionaron 270  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O libre, para llevar a una concentración de 10 pmoles/ $\mu\text{l}$ .

4. Se realizaron 3 alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  del preparado anterior (10 pmoles/ $\mu\text{l}$ ).



***Preparación de los dNTPs***

1. Se extrajeron 40  $\mu$ l de cada uno ( A-G-C-T) y se mezclaron
  - 40  $\mu$ l de A
  - 40  $\mu$ l de G
  - 40  $\mu$ l de C
  - 40  $\mu$ l de T
2. Se juntó la preparación anterior con 240  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre para llevar a un total de 400  $\mu$ l a una concentración de 10 mM.
3. Se realizaron 4 alícuotas de 100  $\mu$ l del procedimiento anterior.

***Preparación del MIX***

1. Se Juntó (1x):
  - 8,8  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O libre
  - 2,5  $\mu$ l de 10x TopTaq PCR Buffer
  - 2,5  $\mu$ l de 10x CoralLoad Concentrate
  - 5  $\mu$ l de 5x Q-Solution
  - 1  $\mu$ l de dNTP mix
  - 2  $\mu$ l de SodA d1
  - 2  $\mu$ l de SodA d2
  - 0,2  $\mu$ l de TopTaq DNA Polymerase

Para un total de 24  $\mu$ l, al cual se le adicionó 1  $\mu$ l de ADN para llegar a los 25  $\mu$ l  
totales

## **Calibración el Termociclador**

### **SodA-d1 y SodA-d2**

1. Desnaturalización inicial: 94°C por 10 minutos
2. Amplificación (30 ciclos)
  - a. Desnaturalización 94°C por 1 minuto
  - b. Annealing: 46°C por 1.5 minutos
  - c. Elongación: 72°C por 1 minuto
3. Extensión final: 72°C por 7 minutos
4. Conservación: 4°C ∞

Las secuencias de los primers SodA d1 y SodA d2 ( GenBank Z95901 ) la cual cuenta con 435 bp, se utilizó para detectar la SeM. Las bases de dicho primer con las cuales se trabajo son las siguientes, basadas en el trabajo de Poyart y colaboradores (Poyart, Quesne, Coulon, Berche & Trieu-cuot, 1998).

Gráfica 1: Pares de bases del primer SodA

1	tattttgaca	cagaaacaat	gacgcttcat	catgataagc	accatgccac	ctatgtggct
61	aataccaaca	ctgctttgga	aaaatacca	gagctaggag	aaaatttaga	ggaattatta
121	gcagatgtaa	gcagcattcc	tgctgacatt	cgtcaggctg	tgattaataa	tggcggggc
181	catttgaacc	atgcgctttt	ctgggagctg	ctttctccag	aaaagcaaga	ggtttctgct
241	gatgtcgcag	cagctattga	tgacgctttt	ggttcctttg	ctgcctttaa	agagcaattc
301	acagcagcag	ctacgggtcg	ttttggctca	ggttgggctt	ggctgggtgt	gaataaggct
361	ggtcagcttg	aatcacatc	aactgcta	caggacacac	caatctcaga	gggcaagcag
421	cctatttttag	cactt				

## **Análisis de los datos**

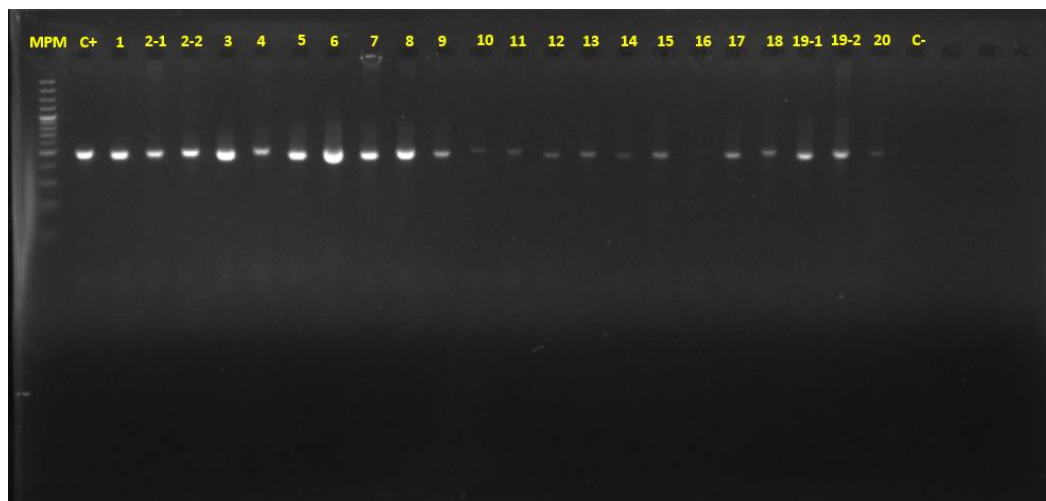
Los datos que se obtuvieron de las fuentes primarias, fueron procesados en una hoja de cálculo de Excel (*Microsoft Office*®).

## Resultados

Basados en las características de crecimiento según Freeman en 2015, se determinó por cultivo que del total de 126 equinos muestreados, 20 fueron positivos según sus características de crecimiento similares a las de *Streptococcus equi*, correspondiendo esto a una prevalencia por cultivo del 15.87%.

Al realizar PCR convencional con el primer SodA d1 y SodA d2, se obtuvo como resultado que de las 20 muestras positivas por cultivo ver gráfica número dos, 19 fueron positivas por PCR, correspondiendo de esta manera a una prevalencia de *Streptococcus equi* del 15% en el municipio de Caldas-Antioquia; así mismo se determinó que del 15% de los positivos, el 85% son asintomáticos y el 15% restante evidenciaron síntomas de la enfermedad, ver la tabla número uno.

Gráfica 2: Gel de electroforesis con Primer Soda, el número 2 y 19 presentan 2 muestras debido a la formación en el cultivo de dos colonias diferentes que realizaban  $\beta$ -hemólisis



<b>Equino</b>	<b>Signos clínicos</b>	<b>Cultivo con características de <math>\beta</math>-hemolítico – coco Gram +, catalasa negativo.</b>	<b>Extracción de ADN efectiva</b>	<b>PCR positiva al primer SodA</b>
<b>1</b>	NO	SI	SI	SI
<b>2</b>	NO	SI	SI	SI
<b>3</b>	NO	SI	SI	SI
<b>4</b>	SI	SI	SI	SI
<b>5</b>	NO	SI	SI	SI
<b>6</b>	NO	SI	SI	SI
<b>7</b>	SI	SI	SI	SI
<b>8</b>	NO	SI	SI	SI
<b>9</b>	SI	SI	SI	SI
<b>10</b>	NO	SI	SI	SI
<b>11</b>	NO	SI	SI	SI
<b>12</b>	NO	SI	SI	SI
<b>13</b>	NO	SI	SI	SI
<b>14</b>	NO	SI	SI	SI
<b>15</b>	NO	SI	SI	SI
<b>16</b>	NO	SI	SI	NO
<b>17</b>	NO	SI	SI	SI
<b>18</b>	NO	SI	SI	SI
<b>19</b>	NO	SI	SI	SI
<b>20</b>	NO	SI	SI	SI

Tabla 1: Relación de los equinos con la presentación de signos clínicos compatibles a los presentados en la infección por *Streptococcus equi*, características del cultivo, extracción de ADN y PCR positiva.

## Discusión

Debido a que son pocas las investigaciones que se han realizado sobre la prevalencia del *Streptococcus equi* en diferentes partes del mundo, es difícil determinar relaciones sobre los resultados obtenidos de la investigación, pero es de destacar que cada día va creciendo más el interés sobre esta patología, por lo cual se contribuye con este proyecto a bases para futuras investigaciones.

En estudios previos se ha determinado una prevalencia del 10% en EEUU (Waller, 2014), 90% en Irlanda (Moloney, et al. 2013), 9,5% en Israel (Tirosh-Levy, et al. 2016), y del 2,3% en Brasil (Libardoni, et al. 2016). por lo cual encontrarse una prevalencia del 15% en Caldas-Antioquia permite determinar que al igual que en otras partes del mundo se encuentran equinos positivos para *Streptococcus equi*, los cuales cursan con patologías respiratorias similares a las determinadas en esta investigación, y que igualmente se relacionan con la literatura de reportes colombianas (Arias, 2013); esto resaltando claramente la resistencia del microorganismo a diferentes ambientes y condiciones para su permanencia durante el tiempo, encontrando dichos equinos como portadores asintomáticos. Los protocolos de PCR, Primers y procedimientos realizados fueron exitosos, por lo cual garantiza una adecuada elaboración y base para la investigación.

## Conclusiones y recomendaciones

Con la prevalencia obtenida del 15% se evidenció la presencia de *Streptococcus equi* en los equinos del municipio de Caldas-Antioquia y en Colombia por primera vez, dando pie para múltiples investigaciones tanto en el municipio como en la región, pues es de gran importancia conocer la epidemiología del microorganismo para así mismo buscar medidas de control y manejo, no sólo para los equinos, sino también para los humanos.

La prevalencia obtenida se encuentra dentro de los valores que se esperaban encontrar, por lo cual se debería pensar en un estudio que albergue una muestra mayor, para así poder categorizar y evaluar de una manera más adecuada las condiciones o bajo qué características es más frecuente la presentación de casos.

Es de vital importancia el adecuado diagnóstico del *Streptococcus equi*, encontrándose que la PCR convencional favorece un diagnóstico rápido.

## Referencias

Arias, María P. (2013). Strangles: the most prevalent infectious respiratory disease in horses worldwide. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1), 143-159.

Recuperado de: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/2840>

Barakzai, Safia. (2007). *Handbook of Equine Respiratory Endoscopy*. New York: Elsevier Saunders.

Durham, Andy E. (2014). Avoiding the pitfalls and making the most of diagnostic tests for strangles. *Livestock*, 18(6), 244. Recuperado de: <http://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/live.2013.18.6.244>

Freeman, David E. (2015). Update on disorders and treatment of the guttural pouch. *Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 31(1), 63-89. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25770066>

Holden, Matthew T., et al. (2009). Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathog*, 5(3). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325880>

Libardoni, Felipe., et al. (2016). Prevalence of *Streptococcus equi* subsp. *equi* in horse and associated risk factors in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Research in Veterinary Science*, 104: 53-57. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Prevalence+of+Streptococcus+equi+subsp.+equi+in+horse+and+associated+risk+factors+in+the+State+of+Rio+Grande+do+Sul+Brazil>



Lindahl, Susanne. Baverud, Viveca. Egenvall, Agneta. Aspán, Anna & Pringle, John. (2013). Comparison of sampling sites and laboratory diagnostic tests for *S. equi* subsp. *Equi* in horses from confirmed strangles outbreaks. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(3), 542-547. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23527817>

Ma, Zhe. Zhang, Hui. Zheng, Junxi. Li, Yue. Yi, Li. (2012). Interaction between M-Like Protein and Macrophage Thioredoxin Facilitates Antiphagocytosis for *Streptococcus equi* ssp. *zoepidemicus*. *PLoS Pathog*, 7(2). Recuperado de: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032099>

Mallicote, Martha. (2015). Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* infections. *Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 31(1), 27-41. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600455>

McClure, Scott R. Sibert, Justin G. Hallberg, Jenny & Bade, Donald. (2011). Efficacy of a 2-dose regimen of a sustained release ceftiofur suspension in horses with *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* bronchopneumonia. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 34(5), 442-447. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21303377>

Molina Diaz, Victor Manuel. (2016). *Farmacologia veterinaria*. Caldas: Editorial Lasallista. pag. 87-88.

Moloney, Emma. Kavanagh, Kerrie S. Buckley, Tom C & Cooney, Jakki C. (2013). Lineages of *Streptococcus equi* ssp. *equi* in the Irish equine industry. *Irish Veterinary Journal*, 66(1). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3679875/>

Moraes, Carina Martins., et al. (2009). Immunogenicity and cross reactivity indices of *Streptococcus equi* subsp. *equi* strains isolated from cases of Strangles and commercial vaccines. *Ciência Rural*, 39(5), 1459-1464. Recuperado de: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782009000500024](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000500024)

Pelkonen, Sinikka., et al. (2013). Transmission of *Streptococcus equi* Subspecies *zooepidemicus* infection from horses to humans. *Emerging Infectious Diseases*, 19(7), 1041-1048. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3713971/>

Pisoni, Giuliano. Zadoks, Ruth N. Vimercati, Chiara. Locatelli, Cecilia. Zaroni, Maria G & Moroni, Paolo. (2009). Epidemiological investigation of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* involved in clinical mastitis in dairy goats. *American Dairy Science Association*, 92(3). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19233787?report=abstract>

Poulin, Marie F & Boivin, Guy. (2009). A case of disseminated infection caused by *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 20(2), 59-61. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706407/>

Poyart, Claire. Quesne, Gilles. Coulon, Stephane. Berche, Patrick & Trieu-cuot, Patrick. (1998). Identification of Streptococci to Species Level by Sequencing the Gene Encoding the Manganese-Dependent Superoxide Dismutase. *Journal of clinical microbiology*, 36(1), 41-47. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9431917>

Reed, Stephen M. Bayly, Warwick & Sellon, Debra C. (2009). *Equine Internal Medicine*. St. Louis: Elsevier Saunders.

Reuss, Sarah M & Giguère, Steeve. (2015). Update on bacterial pneumonia and pleuropneumonia in the adult horse. *Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 31(1), 105-120. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600453>

Tirosh-Levy, S., et al. (2016). *Streptococcus equi* subspecies *equi* in horse in Israel: seroprevalence and strain types. *Veterinary Record Open*, 3(1). Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Streptococcus+equi+subspecies+equi+in+horse+in+Israel%3A+seroprevalence+and+strain+types>.

Waller, Andrew. (2014). New perspectives for diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. *Veterinary clinics of North America: Equine practice*, 30(3), 591-607. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25300634>

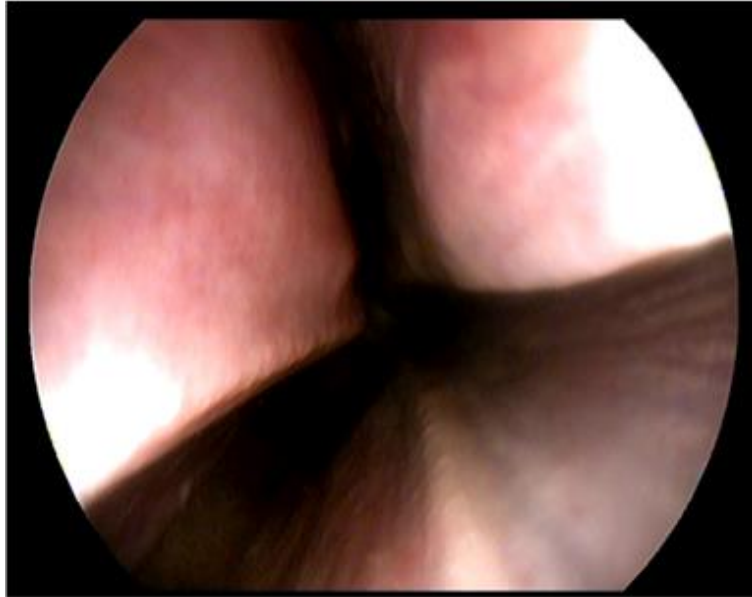
Walshe, Nicola & Duggan, Vivienne. (2011). Equine Strangles: A Review. *Veterinary Ireland Journal*, 1(8), 459. Recuperado de: <http://connection.ebscohost.com/c/articles/86200502/equine-strangles-review>

Webb, Katy., et al. (2013). Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *Veterinary Journal*, 195(3), 300–304. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3611602/>

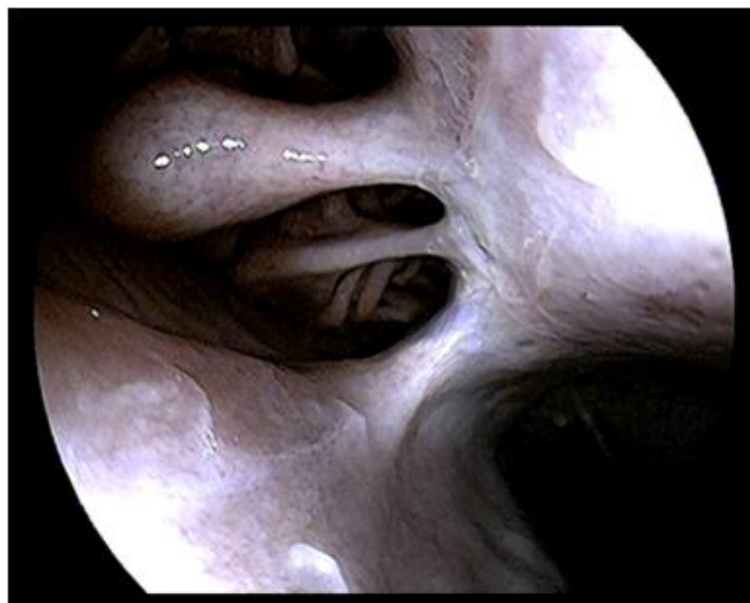
## Apéndices

### Apéndice A. Procedimiento de la endoscopia

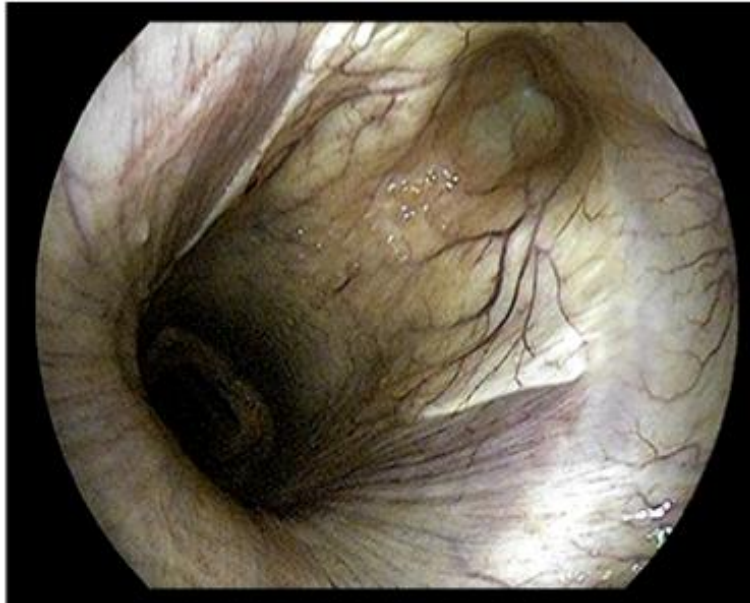
Ingresa del endoscopio por el ollar a lo largo del meato ventral



Cornetes etmoidales, se evita su laceración dirigiendo hacia ventral el endoscopio



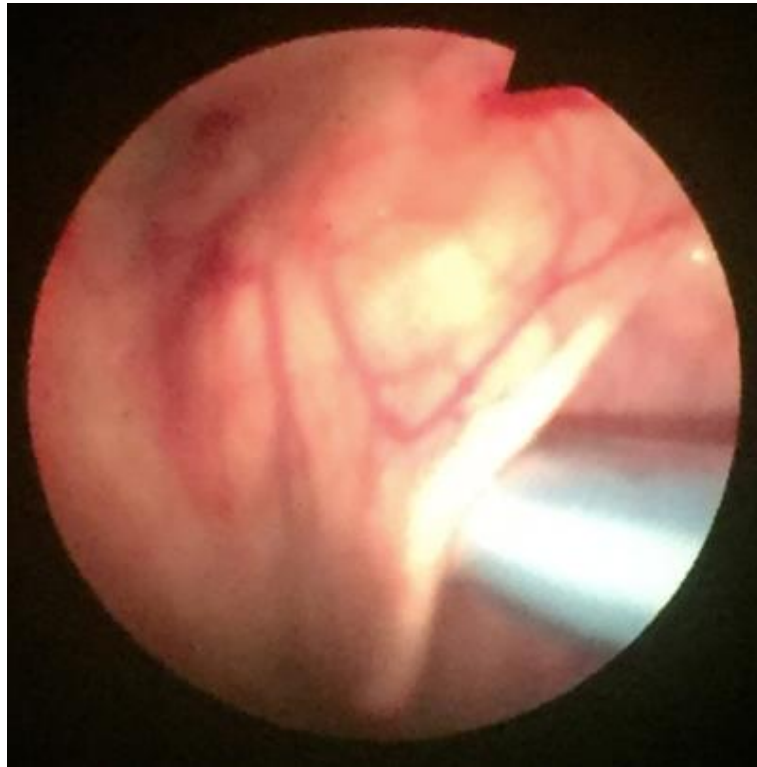
Nasofaringe, se observan las 2 plicas guturofaringeas y el receso dorsal, se dirige el endoscopio hacia la plica de interés



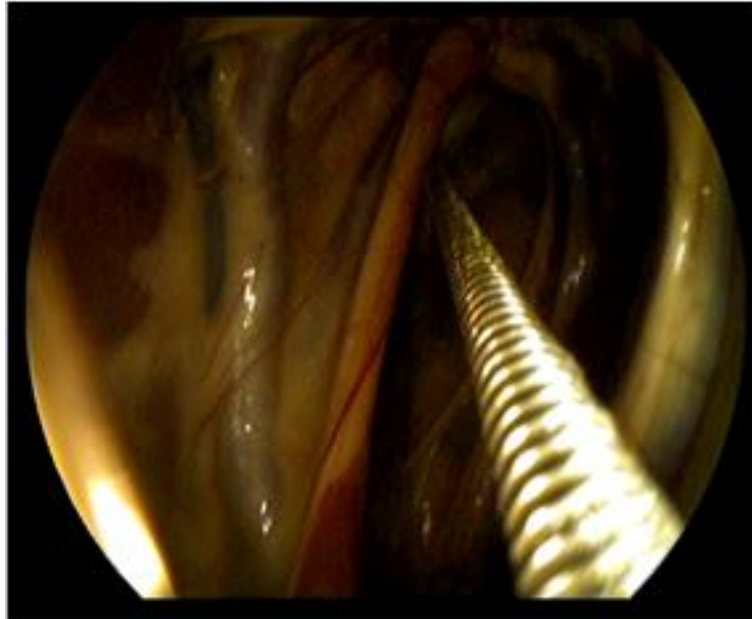
Con ayuda de la guaya se abre la plica para posteriormente ingresar el hisopo, después de realizar el hisopado se puede ingresar el endoscopio para observar la posible presencia de pus caseificado y evaluar las estructuras presentes



Ingreso del hisopo a través de la plica guturofaringea para realizar la toma de la muestra



Ingreso del endoscopio a través de la plica guturofaringea para observar las estructuras internas

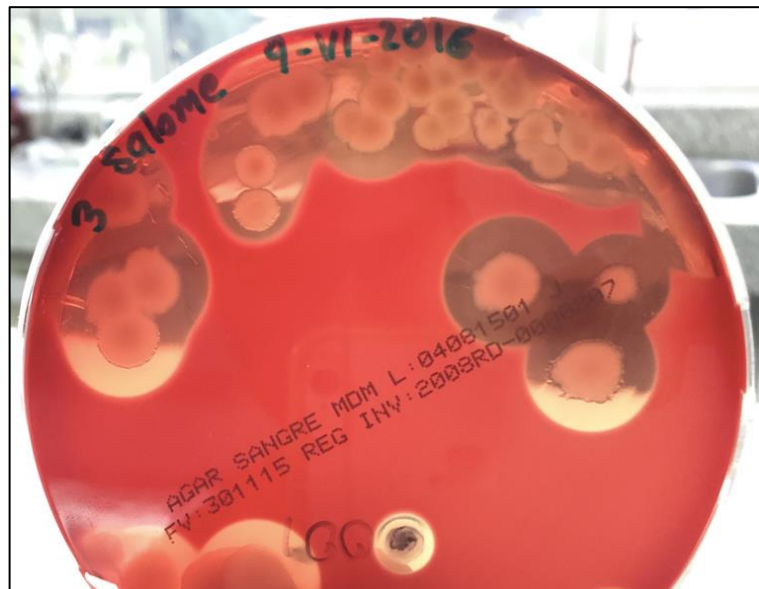


Estructuras internas de la bolsa gutural



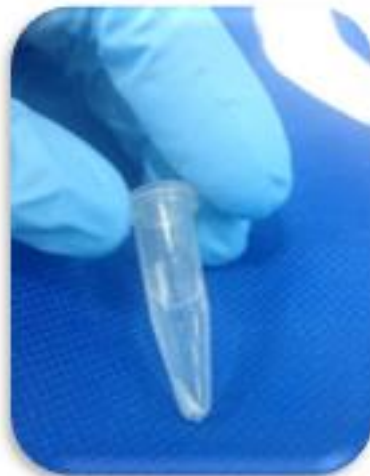
### Apéndice B. Cultivo en agar sangre

Características visuales de crecimiento en agar sangre



### Apéndice C. Procedimiento de PCR

Tubo de micro-centrifuga con cultivo de una muestra positiva



Termociclador de PCR convencional, se introducen las muestras preparadas

(Mix) y se realiza el protocolo del primer SodA





Cámara de electroforesis, se prepara el gel y se depositan en los posos las muestras procesadas en el termociclador



Fotodocumentador, se revela el gel de la electroforesis, para así evaluar el resultado de los protocolos

