

**UNIVERSIDAD AUTONOMA  
GABRIEL RENE MORENO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“EVALUACION DEL METODO REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNOSTICO DE LA TRIPANOSOMIASIS BOVINA” (Prov. Yacuma Dpto. Beni).**

**Borrador de Tesis de Grado presentada  
por:**

Giovana Landívar Chávez

**Para obtener el Título de:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**ASESORES:**

Dr. José Luis Gonzales

Dr. Hugo Rivera C.

Dr. Walter Ascarrunz

**Santa Cruz de la Sierra – Bolivia**

**2005**

## **DEDICATORIA**

- A mis padres Paúl Landívar y Sara Chávez , por su infinito amor y el incentivo a formarme profesionalmente.
- A mi hermano Miguel Ángel, por todo el cariño y la comprensión que me ha ofrecido.
- A mi esposo Luis Alberto Banegas, por el amor que me ha brindado y su apoyo incondicional en mi formación profesional.
- A mi pequeña hija Bella Gione, por ser el aliciente a superarme.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A Dios, por sembrar en mí el espíritu de valentía, para superar todos los problemas y situaciones difíciles en la vida.
- A mis suegros Humberto Banegas y Elva Rosales por el apoyo para concluir este trabajo y continuar superándome.
- A la Dra. Marinely Rosales, por sus buenos consejos que me ayudaron a continuar luchando.
- A la Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, por que en ella pude prepararme profesionalmente.
- A los docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser la guía en mi formación profesional y al personal administrativo por la colaboración recibida.
- A mis asesores Dr. José Luis Gonzales, Dr. Hugo Ribera, Dr. Walter Ascarrunz, por haberme guiado con mucha paciencia en la realización de éste trabajo de tesis.
- A mis tribunales Dr. José Luis Vaca, Dr. Sergio Santa Cruz G.y Dr. Emilio Arce T., por la atención prestada y la guía para la realización del presente trabajo.

## INDICE

TITULO .....	i
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
INDICE DE CONTENIDO .....	iv
INDICE DE GRAFICO .....	vi
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCION .....	2
III. REVISION BIBLIOGRAFIA .....	4
3.1 PROTOZOOS .....	4
3.2 TRIOPANOSOMIASIS .....	4
3.2.1 CONCEPTO .....	4
3.2.2 TAXONOMIA .....	5
3.2.3 TRIPANOSOMAS QUE ATACAN A LOS BOVINOS .....	8
3.3 GENERALIDADES DE LOS TRIPANOSOMAS .....	9
3.3.1 ESTADIOS DEL CICLO BIOLOGICOS .....	10
3.3.2 CICLO BIOLOGICO DE LOS TRIPANOSOMIASIS .....	11
3.4 TRIPANOSOMIASIS POR <i>T.vivax</i> .....	12
3.4.1 DEFINICIÓN .....	12
3.4.2 HOSPEDEROS .....	12
3.4.3 MORFOLOGIA .....	13
3.4.4 DISTRIBUCION .....	13
3.4.5 EPIZOOTIOLOGIA Y TRANSMISION .....	14
3.4.6 SIGNOS CLINICOS .....	15
3.4.7 PATOGENIA .....	16
3.4.8 LESIONES .....	17
3.5 TRIPANOSOMIASIS POR <i>T.evansi</i> .....	18

3.5.1	DEFINICION .....	18
3.5.2	MORFOLOGIA .....	18
3.5.3	TRANSMISION .....	18
3.5.4	PATOGENIA .....	19
3.5.5	SINTOMAS .....	19
3.6	DIAGNOSTICO .....	19
3.6.1	METODO DE DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO .....	20
3.6.2	METODO DE DIAGNOSTICO SEROLOGICO .....	20
3.6.3	METODO DE DIAGNOSTICO MOLECULAR(PCR) .....	21
3.7	INMUNIDAD .....	24
3.8	MEDIDAS DE CONTROL DE LA TRIPANOSOMIASIS .....	25
3.9	TRATAMIENTO .....	26
IV	RESULTADOS .....	28
4.1	MATERIAL .....	28
4.1.1	LOCALIZACION DEL AREA .....	28
4.1.2	UNIDAD DE MUESTREO .....	28
4.2	METODOS .....	29
4.2.1	METODOS DE CAMPO .....	29
4.2.2	METODOS DE LABORATORIO .....	29
4.2.2.1	METODO DE DIAGNOSTICO PARASITOLOGICO .....	29
4.2.2.2	METODO DE DIAGNOSTICO DE PCR .....	30
4.2.2.3	EXTRACCION DE ADN DE LAS GOTAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO .....	30

4.2.2.4	AMPLIFICACION DEL ADN .....	30
4.2.2.5	ELECTROFORESIS .....	32
4.3	METODOS ESTADISTICOS .....	32
.....		
V.	RESULTADOS .....	33
5.1	EVALUACION DE LOS PRIMERS Y CONTROLES I PCR .....	33
5.2	DIAGNOSTICC SOMIASIS .....	33
5.3	CONCORDANCIA ENIRE LOS METODOS PARASITOLOGICOS Y EL PCR .....	34
5.4	PREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMIASIS BOVINA .....	34
5.5	FACTORES DE RIESGOS DE LA TRIPANOSOMIASIS .....	34
VI.	DISCUSION .....	40
VII.	CONCLUSION .....	42
VIII	BIBLIOGRAFIA .....	43

## **INDICE DE GRAFICOS**

Nº 1.	PROPORCIÓN DE POSITIVOS ENCONTRADOS EN LOS DIFERENTES PRUEBAS .....	36
Nº 2.	PROPORCIÓN DE ANIMALES POSITIVOS TRIPANOSOMIASIS POR SEXO .....	37
Nº 3.	PROPORCIÓN DE ANIMALES POSITIVOS TRIPANOSOMIASIS POR RAZA .....	38
Nº 4.	PROPORCIÓN DE ANIMALES POSITIVOS TRIPANOSOMIASIS POR EDAD .....	39

# EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TRIPANOSOMIASIS BOVINA.( En la Provincia de Santa Ana de Yacuma, Departamento del Beni)<sup>1</sup>

Landívar Ch. G<sup>2</sup>., Gonzales J. L<sup>3</sup>., Ribera H. C<sup>4</sup>., Ascarrunz W<sup>5</sup>.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.G.R.M.

## I. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo, fue evaluar el método de PCR aplicado en muestras de campo tomadas en la provincia de Santa Ana de Yacuma, para el diagnóstico de la Tripanosomiasis bovina (*T. evansi* y *T. vivax*) y con los resultados determinar la prevalencia de la enfermedad en la región. Se recolectaron 150 muestras al azar, las cuales fueron procesadas en LIDIVET mediante los métodos parasitológicos de frotis sanguíneo, método de centrifugación en microhematocrito (MCMHT), y también el método de diagnóstico molecular (PCR). Los resultados obtenidos en estas pruebas fueron; en el método de PCR para *T. vivax*, siete muestras positivas con una prevalencia de 4,66%, para PCR *T. evansi*, dos positivas (1,33%); en el frotis *T. vivax* fueron negativas y en el método de centrifugación de microhematocrito no se observaron muestras positivas. El método de PCR demostró una mayor sensibilidad y especificidad comparado con los métodos parasitológicos.

---

<sup>1</sup> Tesis de Grado presentada por Landívar Ch. Giovana, para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista

<sup>2</sup> Villa Warnes; Calle Rubén Terrazas # 173 Santa Cruz Bolivia

<sup>3</sup> Médico Veterinario, Titular de Laboratorio de Investigación Veterinaria y Diagnóstico LIDIVET, Santa Cruz Bolivia

<sup>4</sup> Médico Veterinario, Titular de Laboratorio de Investigación Veterinaria y Diagnóstico LIDIVET, Santa Cruz Bolivia

<sup>5</sup> Médico Veterinario, Docente Titular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Santa Cruz Bolivia

## II.INTRODUCCIÓN

La economía mundial y del país está sustentada en gran parte por la producción agropecuaria, siendo la crianza del ganado bovino un área muy importante y por lo tanto todo lo que afecte negativamente a su producción repercutirá en pérdidas económicas que afectarán no solo a los productores sino a la región.

Es sabido que las parasitosis afectan en el desarrollo de la pecuaria, y si consideramos que un buen diagnóstico es fundamental para un buen tratamiento nos ocupamos en este cometido de la tripanosomiasis bovina realizando la evaluación del método de PCR.

La tripanosomiasis bovina es una enfermedad parasitaria producida por los hemoprotozoarios de género *Trypanosoma*, en Sudamérica la enfermedad es causada principalmente por el *T. vivax* y el *T. evansi* pertenecientes a la sección salivaria, en nuestro continente la transmisión es totalmente mecánica por medio del tábano, debido a la ausencia de la mosca *Tsetse* donde se llevan a cabo los diferentes cambios biológicos del parásito (Hall y col., 1993).

La Tripanosomiasis en América del Sur, fue reportada por primera vez por Leger y Vienne (1919), en la Guayana Francesa, desde entonces la enfermedad se diseminó en el continente, llegando al Brasil por el Pantanal y a Bolivia por las Tierras bajas. Se cree que el *T. vivax* hubiese llegado al departamento de Santa Cruz, a través de los bovinos infectados provenientes del Norte del Brasil (Silva y col.,1998). Posteriormente otros brotes de ésta enfermedad fueron registrados en la región del Beni (Cuellar y Carrique, 1998).

Estudios realizados en el departamento de Santa Cruz, demuestran que las épocas lluviosas representan el período de mayor abundancia de tábanos que son los vectores mecánicos de la enfermedad (Hall y col.,1993; 2001).

El diagnóstico de la tripanosomiasis es basado principalmente en métodos parasitológicos ( centrifugación de microhematocrito a realizarse en situ, y observación de frotis de sangre teñidos con coloración Giemsa), los cuales tienen una baja sensibilidad, de modo que no detectan animales infectados con niveles bajos de parasitemia. Alternativamente métodos serológicos (inmunofluorescencia indirecta, test de aglutinación directa, Elisa, CATT, también son empleados en el diagnóstico de la tripanosomiasis, pero éstos también reportaron problemas en cuanto a su especificidad (Masake, 1998).

En recientes investigaciones el método de diagnóstico molecular, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) trae aparentemente las respuestas a los problemas de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la tripanosomiasis, observados con pruebas serológicas y parasitológicas (Gonzales,2002). Además con la técnica del PCR se buscará obtener datos más satisfactorios sobre la presencia de los tripanosomas en bovinos, datos que son necesarios para el desarrollo de estrategias eficaces de control contra los tripanosomas.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) Evaluar a campo el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa, para el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina en la provincia de Yacuma departamento del Beni. b) Determinar la prevalencia de ADN de *T. vivax* y *T. evansi* mediante la prueba de PCR. c) Determinar la prevalencia de tripanosomiasis bovina en la Prov. Yacuma-Beni. d) Comparar los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR y la parasitológica.

### III. REVISION BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1.- PROTOZOOS

Los protozoos son animales unicelulares, en los que las actividades diversas del organismo se llevan a cabo por orgánulos de la célula. Poseen un núcleo bien definido y no presentan pared celular rígida, lo que permite, al mismo tiempo una variación marcada de tamaño y forma (Norman, 1983).

Desde que Antoni Van Leeuwenhoeck descubrió los protozoos, se han descrito unas 45.000 especies. La mayoría son de vida libre y habitan en medios terrestres y acuáticos. Aunque los protozoos parásitos son menos numerosos, tienen un papel importante como productores de enfermedad en el sentido amplio de la palabra, ya que, aparte de ocasionar muerte y deformación, agotan la energía y la iniciativa (Soulsby, 1987).

#### 3.2.- TRIPANOSOMIASIS

##### 3.2.1.- CONCEPTO

El nombre de tripanosomiasis se aplica al grupo de enfermedades infecciosas agudas o crónicas del hombre y de los animales domésticos y silvestres, producidos por protozoos flagelados pertenecientes al género *Tripanosoma*, transmitidos, por moscas chupadoras de sangre, tábanos y vinchucas (Norman, 1983).

### 3.2.2.- TAXONOMIA

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: ***Trypanosoma***

**Phylum Sarcomastigophora.**- Con flagelos, pseudópodos o ambos, núcleo único, generalmente no forman esporas, reproducción sexual, si existen, básicamente singamia.

**Subphylum Mastigophora.**- Trofozoitos con uno o más flagelos, reproducción asexual, fusión binaria, en muchos grupos, se desconocen mecanismos de reproducción sexual.

**Clase Zoomastigophorea.**- Son protozoos flagelados, con uno o más flagelos en forma de látigo; el núcleo es de tipo vesicular; carecen de cromatóforos; el aparato neuromotor está constituido por un blefaroblasto granular, o gránulo basal, del que emerge el axonema.

**Orden kinetoplastida.**- Posee uno o cuatro flagelos; el kinetoplasto contiene ADN, y forma parte de la mitocondria que, en el caso de los ***Trypanosomas***, recorre la longitud total del cuerpo.

**Familia Trypanosomatidae.**- Con forma de hoja, pueden ser redondeadas.

**Género Trypanosoma.**- Son parásitos de la sangre, linfa, tejidos o cavidades de toda clase de vertebrados y artrópodos. Su desarrollo puede incluir las etapas de tripomastigote, epimastigote, promastigote y amastigote. En muchas especies en el hospedador vertebrado solo aparecen tripomastigote, que se caracterizan por su

especial aptitud patógena para el hombre y los animales (Soulsby, 1987).

Los tripanosomas de este género están ubicados dentro de una de dos secciones de acuerdo a la localización en el vector y en el mamífero. La sección Stercoraria contiene género en el cual el parásito completa este ciclo evolutivo en la "sección posterior", apareciendo el estadio infectivo el cual se elimina por las heces del vector. La reproducción en el mamífero es discontinua y usualmente toma lugar en el estadio Amastigota y Epimastigota. La sección Salivaria contiene género que su ciclo evolutivo en el vector es completada en la "sección anterior", es decir en la parte media y/o partes bucales y la reproducción en el hospedero ocurre en el estadio tripomastigota (Hoare, 1964; Stephen, 1986).

Una clasificación práctica de los ***Trypanosoma*** de importancia médica y veterinaria, es como sigue, y está basada principalmente en criterios morfológicos y biológicos.

**GÉNERO SALIVARIA**

**Subgénero** Duttonella

**Especie:** ***Trypanosoma vivax***

**Subgénero** Nannomonas

**Especies:** ***Trypanosoma congolense, T. simiae.***

**Subgénero** Trypanozoon

**Especies:** ***Trypanosoma brucei, T. rhodesiense, T. gambiense, T. evansi y T. Equiperdum.***

**Subgénero** Pycnomonas

**Especie:** ***Trypanosoma suis***

**GÉNERO STERCORARIA**

**Subgénero** Schizotripanum

**Especies:** *Trypanosoma cruzi* (Losos, 1986)

Según se pudo observar durante el desarrollo del presente estudio, los parásitos que conciernen a este estudio son *T. vivax* y *T. evansi*, que muestran líneas morfológicas, biológicas y genéticas similares entre ellas y las otras especies que pertenecen a la sección Salivaria. Esas similitudes pueden complicar el intento de detectar la presencia de esos parásitos en estudios epidemiológicos. (Gonzales, comunicación personal)

### 3.2.3.- TRYPANOSOMAS QUE ATACAN A LOS BOVINOS

#### SECCIÓN STERCORARIA

Especie	Huésped definitivo	Huésped intermed./Vector	Distribución geográfica	Enfermedad
<b>T. theileri</b>	Bovinos	Tábanos	Cosmopolita	Ninguna
<i>T. melophagium</i>	Ovinos, bovinos	Melophagus ovinus	Zonas templadas	Ninguna
<i>T. cruzi</i>	Hombre, gatos, perros, cerdos, etc.	Vinchuca (Triatoma spp.)	América del Sur	Enfermedad de Chagas

(Hoare, 1964; Stephen, 1986)

#### SECCIÓN SALIVARIA

Especie	Huésped definitivo	Huésped intermed./Vector	Distribución geográfica	Enfermedad
---------	--------------------	--------------------------	-------------------------	------------

<b>T. vivax</b>	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos y camello.	Mosca tsetsé (Glossina, sp p.) Stomoxys calcitrans y tábanos.	África tropical, América central y de Sur.	Tripanosomiasis
<b>T. caprae</b>	Caballos, ovinos .	Mosca tsetsé	Tanzania, Malawi.	Tripanosomiasis
<b>T. congolense</b>	Bovinos, ovinos, caprinos, equinos, cerdos, perros y camellos.	Mosca tsetsé	África tropical	Tripanosomiasis
<b>T. brucei</b>	Hombre, rumiantes domésticos y salvajes.	Mosca tsetsé	África tropical	Nagana
<b>T. evansi</b>	Equinos, caprinos, ovinos y bovinos (son reservorios)	Tábanos y Stomoxys calcitrans.	Cosmopolita	Surra y mal de cadera.

(Hoare, 1964; Stephen, 1986)

### 3.3.- GENERALIDADES DE LOS TRIPANOSOMAS

Los tripanosomas están entre los más primitivos entre los eucariotas y, debido a sus líneas ancestrales no es sorprendente que presenten

propiedades biológicas no usuales. Ellos están entre los primeros eucariontes que tienen mitocondria y una de sus mas remarcables características es de su DNA mitocontrial, conocido como DNA kinetoplástico (kDNA). Contrario a cualquier otro DNA en la naturaleza, el kDNA esta organizado dentro de una red conteniendo varios millones de círculos de DNA íter ligados topológicamente. Los círculos son de dos tipos. Hay varios millares de pequeños minicírculos en unas pocas decenas de maxicírculos. Cada célula contiene una única red dentro de la matriz de su única mitocondria (Englund y col, 1996).

Los tripanosomas exhiben considerable diversidad genética de intra especies y variación de la cual tienen complicada su clasificación taxonómica (Myler, 1993).

Esta diversidad y variación puede ser definida en ambos niveles de genoma y genes individuales. El genoma nuclear muestra una considerable plasticidad de inter e intra especies en términos de números de cromosomas y tamaño. El genoma mitocondrial (KDNA) también varia considerablemente entre especies, especialmente en términos de tamaño de mini y maxicírculos y organización. Hay también una considerable diversidad de secuencias intra específica en los mini círculos y dentro de la región variable de los maxicírculos (Aguilar, 1998).

### **3.3.1.-ESTADÍOS DEL CICLO BIOLÓGICO**

- Trymastigote (previamente, estado tripanosómico).- Tiene forma lanceolada con uno kinetoplasto situado detrás del núcleo y generalmente, próximo al extremo posterior. Presenta una membrana ondulante bien desarrollada y un flagelo libre. Con frecuencia esta fase se encuentra en el hospedador vertebrado, pero también se puede localizar los artrópodos, como la forma infectante del hospedador vertebrado.
- Epimastigote (previamente, forma crithidial) tanto el kinetoplasto como el axonema yacen por delante del núcleo y la membrana ondulante es corta. En unas pocas especies esta etapa aparece en el vertebrado como parte del ciclo de desarrollo en dicho hospedador, pero principalmente se trata de un estado de los artrópodos.
- Promastigote (previamente, forma leptomonadica) el kinetoplasto y el axonema están en el extremo anterior del cuerpo, no tiene membrana ondulante. Se presentan en artrópodos o plantas.
- Amastigote (previamente, forma leishmania) el cuerpo es redondeado, el flagelo no se presenta o se encuentra reducido a una corta fibrilla. Forma típica de artrópodos y vertebrados, con kinetoplasto (Soulsby, 1987).

### **3.3.2.- CICLO BIOLÓGICO DE LOS TRIPANOSOMAS**

En el insecto vector el ciclo biológico de los tripanosomas se ha observado proceso sexual en algunas especies, tales como el *T. brucei* (Gibson y Stevens, 1999).

Exceptuando a unas pocas especies, como el *T. evansi* y excepcionalmente el *T. vivax*, la mayoría de los tripanosomas experimentan desarrollo cíclico en un artrópodo vector, mosca Tsetsé. Cuando ocurre una transmisión mecánica, frecuentemente se lleva a cabo por la intervención de moscas picadoras tales como *Stomoxys* y *Tabanus*. La mosca picadora se infecta inmediatamente después de alimentarse, pero permanece en este estado solo durante un corto periodo de tiempo, y tienen que ser rápidamente transmitidos. (Aguilar, 1996).

En el hospedador toda la reproducción transcurre por fisión binaria o múltiple, la división comienza en el kinetoplasto, seguida por el núcleo y a continuación el citoplasma. Donde se forma dos células hijas a partir de una célula madre (Soulsby, 1987)

### **3.4.- TRIPANOSOMIASIS POR *T. vivax***

#### **3.4.1.- DEFINICIÓN**

Es una enfermedad parasitaria, causada por el *T. vivax*. En África es transmitida por las moscas Tsetsé (*Glossina spp.*), en América del Sur transmitida por vectores mecánicos hematófagos (*Tabanus*). Es una enfermedad progresivamente anemisante y debilitante, disminuyendo severamente la producción tanto de leche como de carne, pudiendo llevar a la muerte (Hall y col., 1993; 2001).

### 3.4.2.- HOSPEDEROS

El *T. vivax* infecta predominantemente a bovinos, ovinos, equinos, caprinos, búfalos y camellos. En Sud América el parásito esta muy extendida en ganado vacuno (Betancourt, 1978), búfalos (Shaw y Lainson, 1972), ovejas (Gardiner y Mahmoud, 1992; LIDIVET, comunicación personal), cabras (Kubes, 1944), y ciervos salvajes (Davila et al, 1998) también fueron encontrados infectados. A pesar de la muy extendida distribución de la infección en ganado vacuno, los brotes severos de la enfermedad en el continente son esporádicos (Betancourt, 1978; SILVA et al, 1998). Los perros son refractarios a la infección (Shaw y Lainson, 1972).

### 3.4.3.- MORFOLOGÍA

El *T. vivax* es una especie monomórfica, de 20 a 27 micras por 3 micras de espesor. Su porción posterior mas ancha y bulbosa, el kinetoplasto es grande y terminal y presenta un flagelo libre, corto, de 3 a 6 micras de longitud. La membrana ondulante es poco desarrollada. El núcleo es oval y se orienta longitudinalmente. (Soulsby, 1987; Hoare, 1972)

El *T. vivax* en América es morfológicamente similar al de África; en donde se han descrito dos tipos diferentes en sus facciones morfológicas y biológicas: En el oeste de África la forma mas corta mide entre 21,4 a 24,6 micras y en el este de África la forma es más larga midiendo entre 23,6 a 2,6 micras (Fairbain, 1953).

Estudios morfológicos realizados en Sud América sobre el *T. vivax* sugieren que la forma de este parásito es similar que a la del oeste de Africa (Shaw y Lainson, 1972; Wells, 1984; Davila et al, 1998).

Estos estudios reportaron medidas que oscilan entre 15,86 a 23 micras en bovinos de Bolivia y la Guayana francesa respectivamente (Davila et al, 1997).

#### **3.4.4.- DISTRIBUCIÓN**

La Tripanosomiasis por *T. vivax* en el continente americano a sido reportado desde 1919, cuando casos de la enfermedad fueron descritos por primera vez en la Guayana francesa (Leger y Vienne, 1919). Que de acuerdo a Curasson fue introducida a Latinoamérica en 1830 por una embarcación que importaba ganado cebuino desde el Oeste de África.

Aparentemente anticuerpos contra el *T. vivax* fueron reportados en animales de: El salvador, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil y Paraguay (Well et al, 1977). En 1996 la enfermedad cruzó el Amazonas y el *T. vivax* fue identificado en el pantanal brasilero y en las tierras bajas de Bolivia con brotes severos de la enfermedad y muerte (Silva et al, 1998), y según este mismo autor hasta la fecha, el *T. vivax* ha sido confirmado en: Guayana francesa, Surinam, Venezuela, Colombia, Brasil y Bolivia.

#### **3.4.5.- EPIZOOTIOLOGIA Y TRANSMISIÓN**

El *T. vivax* es transmitido clínicamente por las moscas Tsetse y mecánicamente por otras moscas hematófagas. Las moscas de los establos y otros tábanos son vectores solamente en América (Levine, 1973). LA transmisión también puede llevarse a cabo durante vacunaciones masivas, cuando se inyectan diferentes animales con agujas posiblemente contaminadas (Wells y col., 1982; Jones y Davila, 2001).

Por experiencia en el trabajo de campo se sabe que la estación lluviosa y de calor representa el periodo de mayor riesgo de transmisión de tripanosomiasis, debido a que los tábanos son más numerosos por estos meses.

Todos los tripanosomatidos presentan un kinetoplasto el cual contiene el ADN mitocondrial de estos parásitos. Dicho ADN esta formado por maxi y mini círculos (Borst y col., 1987). Los maxi círculos son necesarios en los tripanosomas salivares para la evolución de una mitocondria funcional, para el desarrollo cíclico de estos parásitos en sus vectores transmisores, en este caso la mosca Tsetse. Bajo estas condiciones los protozoarios son transmitidos de forma cíclica, lo cual mantiene la distribución de los tripanosomas y además da lugar al intercambio genético entre los diferentes especies de género *Tripanosoma* (Stevens Y Gibson, 1999), no se han realizado estudios para explicar los mecanismos por el que el *T. vivax* se adapto a ser transmitido en forma no cíclica. Se considera que los transmisores mecánicos del *T. vivax* son moscas chupadoras de sangre, principalmente moscas del género *Tabanidae*, que se caracterizan por realizar alimentaciones interrumpidas antes de la plétora, llevando en sus partes bucales sangre infectada con

tripanosomas entre los animales del hato (Woo, 1977; Dirie y col., 1989).

Estudios realizados en el departamento de Santa Cruz en la provincia de Guarayos y Sara permitieron observar la presencia de *T. vivax* en las partes bucales de siete especies de tábanos, siendo la especie de tábanos mas abundante y con mayor numero de vectores portando tripanosomas, el *Tabanus occidentales* (Halls y col., 2001). También se puede incriminar como potencial transmisor de Tripanosomas salivares a la mosca brava (*Stomoxis calcitrans*) (Serra Freire y Rezende, 1988).

#### **3.4.6.- SIGNOS CLÍNICOS**

En los brotes de *T. vivax* reportados en Mato Grosso del sur, Brasil Santa Cruz, Bolivia, los bovinos afectados presentaron las tres formas clínicas, la hiperaguda caracterizada por hemorragias y muerte, la clínica donde los signos principales son perdida de peso y anemia, y la forma subclínica que puede desaparecer sin necesidad de tratamiento. También se registro la ocurrencia de aborto y cuadros diarreicos. (Silva y col., 1998).

La dinámica del comportamiento de la enfermedad fue un repentino incremento de casos ante la introducción de la infestación, seguida de un decremento cuando el parásito se estableció de manera endémica en la población animal. (Moises, 1998).

### 3.4.7.- PATOGENIA

El *T. vivax* posee un periodo de incubación variable entre 4 a 40 días. Los tripanosomas se multiplican, primeramente, en los tejidos de la puerta de entrada, y mas tarde pasan al torrente circulatorio. Con este procedimiento se origina una infección hemática, y como consecuencia, la tumefacción del bazo y de los ganglios linfáticos. Los gérmenes son lisados en su mayor parte en la sangre por los anticuerpos, que entretanto ha formado el organismo. Las endotoxinas liberadas con ello producen un estado febril. Por tanto, los tripanosomas desaparecen de la sangre, pero vuelven a reaparecer al cabo de algún tiempo. Cuando se han multiplicado en determinados órganos, principalmente en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea, pero se destruyen asimismo por nuevos anticuerpos. Las invasiones periódicas de los tripanosomas se repiten en este sistema, y las endotoxinas liberadas no solo destruyen los glóbulos rojos sino que originan lesiones en las paredes vasculares. (Hutyra-Marek, 1973).

Los animales infectados por el *Trypanosoma*, presentan cambios drásticos en el sistema linfático. En esta parasitosis el síndrome de anemia es el que domina el cuadro clínico. Desarrollándose cuando la parasitemia esta en su nivel mas elevado y teniendo un efecto hemolítico grave, como resultado de la destrucción de una gran cantidad de glóbulos rojos mediante la fagocitosis, los factores que pueden estar involucrados en este proceso son la hemólisis producida por el *Trypanosoma*, procesos inmunológicos, la fiebre, coagulación intra vascular diseminada y una expansión activa mononuclear del sistema fagocítico. Se ha concluido que la muerte de

los bovinos afectados se debe a las combinaciones de anemia, alteraciones micro circulatorias y daños cardíacos (Moises, 1998).

Según estudios realizados dentro del LIDIVET a la semana siguiente de la infección con los ***Tripanosomas*** hemáticos, hay generalmente un descenso marcado de los niveles de hematocrito, hemoglobina, eritrocitos y glóbulos blancos, que pueden llegar al 50% de los niveles preinfección en dos meses.

#### **3.4.8.- LESIONES**

Los hallazgos de la autopsia, en casos de tripanosomiasis, son variables, y no son específicos para la enfermedad. En casos de animales muertos en la forma aguda, hay petequias extensas en las membranas serosas, especialmente en la cavidad peritoneal. Los ganglios linfáticos y el bazo también suelen estar hinchados. En los casos crónicos hay ganglios linfáticos hinchados, atrofia serosa de la grasa y evidencia de anemia (Merck, 2000).

### **3.5.- TRIPANOSOMIASIS POR *T. evansi***

#### **3.5.1.- DEFINICIÓN**

Es una enfermedad parasitaria, causada por el flagelado ***T. evansi***, se encuentra principalmente en caballos, burro, cabra, ovino, camello, cerdo, burro, elefante, capibara y venado. Es transmitido por la picadura de moscas hematófagas. Clínicamente se caracteriza por

fiebre intermitente, anemia, edema, pérdida de peso, progresivo decaimiento, conjuntivitis y abortos. Es causa de una enfermedad de alta mortalidad, conocido con el nombre de surra o el mal de la cadera en los equinos. (Merck, 2000).

### **3.5.2.-MORFOLOGÍA**

Miden de 15-34 mc de longitud y son típicamente monomórficos. Se encuentran en la sangre, tiene forma típica de tripomastigote, comprende formas delgadas intermedias. Las formas delgadas tienen un largo flagelo libre y el extremo posterior estrecho, el que puede ser redondeado o truncado (Quiroz, 1989).

### **3.5.3.- TRANSMISIÓN**

El *T. evansi* es transmitido mecánicamente por moscas picadoras, no hay ningún desarrollo en estas moscas, que actúan únicamente como vectores mecánicos, lo mismo el murciélago hematófago *Desmodus rotundus*, actúan como hospedero y agente transmisor en centro y Sud América (Hoare, 1965).

### **3.5.4.- PATOGENIA**

La acción patógena del *T. evansi* depende de varios factores, tales como susceptibilidad del huésped, grado de patogenicidad de la cepa del parásito que varía de acuerdo con huéspedes y localidades. EL *T. evansi* tiene en principio una acción tóxica sobre el huésped, dada por los productos de secreción y excreción, en segundo lugar un efecto

antigénico, y en tercer lugar una acción mecánica significativa a nivel capilar (Merck, 2000).

### **3.5.5.- SÍNTOMAS Y LESIONES**

En los equinos presenta fiebre intermitente, urticaria, edema en las patas y partes bajas del cuerpo, pérdida de peso, decaimiento progresivo, pérdida de la condición general, inapetencia, aborto, ictericia, problemas nerviosos, incoordinación con parálisis del tren posterior (Quiroz, 1989).

### **3.6.-DIAGNÓSTICO**

Los métodos comúnmente utilizados para diagnosis de tripanosomiasis son los parasitológicos , los serológicos y recientemente se está aplicando métodos de diagnóstico moleculares.( Gonzales, 2002).

#### **3.6.1.-MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO**

Estos métodos están basados en la identificación de los tripanosomas durante su fase en el torrente sanguíneo, sin embargo el problema es que tiene una baja sensibilidad, con un elevado número de animales infectados sin detectar ( Nantulya, 1990).

La prueba de centrifugación de microhematocrito parece que tiene la mayor sensibilidad de los métodos parasitológicos, así lo demuestra Desquesnes en 1997, examinando animales infectados de laboratorio, reportó una sensibilidad del 68% para la prueba de microhematocrito y 59% para la prueba de Buffy coat y recientemente Masake, 2000, reportó una sensibilidad para el Buffy coat de 63% también en animales artificialmente infectados.

Bajo las condiciones en América del Sur y refiriéndonos a Bolivia, con la dificultad de obtener reactivos para utilizar métodos sofisticados de diagnóstico, el método parasitológico resulta muy práctico y económico.( Gonzales, 2002)

### **3.6.2.-MÉTODO DE DIAGNÓSTICO SEROLÓGICOS**

La mayor parte de las pruebas serológicas detectan la presencia de anticuerpos, mientras que otros detectan la presencia de antígenos. El diagnóstico serológico del *T. vivax* en América del Sur es complicado porque se debe diferenciar de la infección con otros dos tripanosomas que también infectan bovinos como el *T. evansi* y *T. theileri* , los cuales tienen componentes en común con el *T. vivax* y pueden dar falsos positivos como resultados. Los métodos serológicos que detectan antígeno, ya fueron descartados para el diagnóstico de la tripanosomiasis, debido a su baja sensibilidad y especificidad (Desquesnes, 1997; Eisler y Col, 1998).

Las técnicas basadas en la detección de anticuerpos, se ven limitadas principalmente por su pobre especificidad, debido a frecuentes problemas de reacciones cruzadas entre las diferentes especies de tripanosomas, dificultando la diferenciación entre estas especies durante el diagnóstico. Además estos métodos no distinguen anticuerpos persistentes, los cuales fueron comprobados que persisten por seis meses en el animal, después que se recuperan (Luckins, 1977).

### **3.6.3.-MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR)**

El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) está siendo considerado como el método que resuelve los problemas de sensibilidad y especificidad de los métodos parasitológicos y serológicos, porque está basado en la destrucción del ADN del parásito. El PCR consiste en la aplicación del material genético (ADN de virus, bacterias, parásitos, etc.), con la ayuda de reactivos específicos (Primers), para cada uno de los patógenos, está basado en la reacción de la polimerasa, que es la enzima que dirige la síntesis de ADN (Masake y Col,1997).

Las ventajas más significativas del PCR son: - especificidad, donde se establecen condiciones de la reacción muy estrictas, de manera que solo se pueda amplificar el microorganismo que estamos buscando detectar; -sensibilidad, donde permite la detección de cantidades muy pequeñas de material genético buscado, siendo esta una gran ventaja sobre otros métodos (Masake y Col, 1997). El método de PCR también ha presentado problemas en las pruebas, por ejemplo, casos en que el método parasitológico fue positivo y resultaron PCR negativos, las probabilidades por las cuales el método de PCR puede fracasar o producir falsos negativos, son:

- Cuando el ADN se ha degradado debido a malas condiciones de conservación.
- Bajas concentraciones de ADN insuficientes para que sean visibles(Morlais y col.,1998;2001).
- Deficiente proceso de extracción del ADN, o presencia de componentes inhibidores en la reacción de PCR(Desquesnes, 1997).
- Presencia de cepas del parásito con diferentes secuencias del genoma(Masiga y col.,1992;Morlais y col.,1998;2001).

El método de PCR para el diagnóstico del *T. vivax* ha sido desarrollado usando como blanco secuencias satélites de ADN específicos para el *T. vivax* ( Masiga y col.,1992;1996), secuencias de ADN codificadas (CADN) que es la secuencia que se expresa en un antígeno de *T. vivax* que es reconocido por un anticuerpo monoclonal TV27 aplicadas en la detección de antígenos en la prueba ELISA. Según estudios realizados han demostrado que la secuencia CADN está presente en todos los stocks de *T. vivax*, provenientes de África y América del Sur y no está presente en otras especies como el *T. brucei* y *T. congolense* (Masake y col.,1994).

De acuerdo a Masake y col., 1997 con la detección de la secuencia de TV27 CADN, diseñaron los primers TWJ1 y TWJ2, los cuales demostraron ser capaces de amplificar segmentos de ADN de stocks Colombianos y Africanos de *T. vivax* , adicionalmente éstos primers no produjeron ningún producto de PCR cuando se probaron con otros protozoos como el *T. brucei*, *T. congolense* y *T. evansi* los autores reportaron un 75% de sensibilidad para el método de PCR, comparado con un 42% para la prueba de Buffy coat y 55% para ELISA.

Recientemente Masake y col.,2002, reportaron una sensibilidad del 93% para PCR , comparado con un 55% para la prueba de Buffy coat.

La prueba de PCR puede detectar la presencia de parásitos con 5 días de infección y además detecta la infección en fases finales de la enfermedad y en estados crónicos, cuando los niveles antigénicos y de parasitemia son indetectables en los métodos parasitológicos y serológicos (Masake y col.,1994).

Estudios realizados en América del Sur llevaron al desarrollo de primers, que son reactivos específicos para cada agente infeccioso en este caso para *T. vivax* (Ventura y col.,1994).

Estudios basados en las secuencias de cepas brasileras donde las secuencias blanco de ciertos primers, fueron demostrados que estan presentes en cepas de todo el mundo, además de ser específicos, éstos primers fueron evaluados con muestras tomadas a campo durante la presentación de un foco de tripanosomiasis en el pantanal de Brasil en 1997. Los resultados de este estudio con el *T. vivax* nos demuestra que de las 45 muestras, 8 fueron positivas a microscopia, mientras que PCR se detectó un 75% de los animales, es decir, 33 muestras positivas(Ventura y col.,2001).

En los resultados del estudio para la identificación del *T. evansi* de las 41 muestras procesadas con el método de PCR se detectaron 12 muestras positivas, mientras que el parasitológico solo logró detectar 2 muestras positivas (Ventura y col.,2002).

### **3.7.-INMUNIDAD**

Los tripanosomas tienen la capacidad de hacer variaciones antigénicas, donde cada período de parasitemia máxima corresponde al desarrollo de una población de tripanosomas de un nuevo tipo antigénico. Cuando ocurre la eliminación de una población de un único tipo antigénico provoca una caída en los niveles sanguíneos de parásitos. No obstante una cierta proporción del grupo de sobrevivientes desarrolla nuevos antígenos de superficie, y se origina una población nueva. Esta fluctuación cíclica en los niveles de parásitos, donde cada valor máximo refleja en la aparición de una población que tiene una nueva variante antigénica, que puede proseguir durante varios meses (Tizard, 1995).

Los antígenos variantes que se producen en la primeras etapas de la infección tienden a desarrollarse en una secuencia, la cual se puede predecir con facilidad. No obstante a medida que la infección progresa, los antígenos variantes empiezan a producirse de una manera más aleatoria. Los tripanosomas que se producen en

el cultivo de tejidos también muestran variaciones antigénicas espontáneas, lo cual demuestra que la variación no es necesariamente inducida por el anticuerpo (Tizard, 1995).

Puede demostrarse con microscopía electrónica que las formas variantes de los antígenos producen una cubierta muy espesa de glucoproteínas sobre la superficie del tripanosoma. Cuando se produce el cambio antigénico las glucoproteínas de la cubierta antigua se desprenden y se reemplazan por una proteína diferente desde el punto de vista antigénico. El análisis de la genética de este proceso indica que los tripanosomas tienen gran cantidad de genes para la proteína de la cubierta, y que la variación antigénica se produce como resultado de un nuevo arreglo y selección de genes producidos al azar (Tizard, 1995).

Teniendo los tripanosomas esta capacidad de variación antigénica, se producen en el animal infectado niveles bajos y altos de parasitemia, y cuando los niveles están bajos no pueden ser detectados por métodos parasitológicos ni serológicos. Por eso es importante el empleo de un método molecular como el PCR.(Gonzales, 2002).

### **3.8.- MEDIDAS DE CONTROL DE LA TRIPANOSOMIASIS**

Por el momento no se dispone de vacunas o algún otro método inmunológico capaz de prevenir la enfermedad, debido a la capacidad del patógeno de desarrollar nuevos antígenos de superficie. Sin embargo se recomienda, utilizar medicamentos preventivos (isometamidium), en los animales que se introducen en las zonas enzoóticas para controlar la infección a tiempo (Quiroz, 1989).

La lucha contra la tripanosomiasis es difícil pues no sólo los animales enfermos, sino que también los aparentemente sanos, son portadores

de parásitos diseminando la infección por los vectores hematófagos, siendo los tábanos los más importantes. Se pueden considerar que los métodos principales para evitar la diseminación de la parasitosis en la región pueden ser los siguientes:

- Diagnóstico clínico y de laboratorio preciso.
- Se recomienda la aplicación de fármacos con un período prolongado (isometamidium, homidium, etc.) en animales que se van a movilizar de áreas sospechosas de estar infectadas.
- Vigilancia epidemiológica constante de los focos endémicos, incentivando al uso de inmunoestimulantes en animales susceptibles.
- Control de los vectores mecánicos (tábanos) con insecticidas como las deltametrinas en su presentación "Pour On".

Es necesario destacar que ante la ausencia de la mosca Tsetse, en el continente americano, las medidas para evitar la diseminación del *T. vivax* y *T. evansi* se enfocan sólo a las moscas picadoras que transmiten el hemoparásito en forma mecánica y en los animales que padecen la infección y pueden transmitirla a los animales sanos en su zona de origen o distante cuando se movilizan o son transportados por el hombre (Aguilar, 1996).

### **3.9.- TRATAMIENTO**

La actual quimioterapia para la tripanosomiasis y los animales domésticos dependen de seis compuestos, algunos de los cuales son químicamente relacionados: diminazene, homidium y el isometamidium son usados para el tratamiento y profilaxis de la tripanosomiasis en bovinos, ovinos y caprinos. La quinapiramina, suramin y la menarsomin son usados como agentes terapéuticos para infecciones con *T. evansi*, sin embargo la quinapiramina sea también

usada para tratamiento profiláctico. Siendo estos tres últimos compuestos solo para equinos, camellos y búfalos (Aguilar, 1996).

En 1997 la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA), y el Programa de Modernización Técnica Agropecuaria de la región central del Brasil (PROMAGRO), realizaron una estimación económica sobre el control de la tripanosomiasis bovina, empleando isometamidium que de acuerdo a las observaciones obtenidas , parece ser el medicamento de elección para las áreas infectadas del Pantanal de Brasil y Santa Cruz-Bolivia, dicho fármaco tiene el nombre comercial de Trypamidium y también ha demostrado ser efectiva para establecer estrategias de prevención contra el *T. vivax* en regiones con alto y mediano riesgo de infestación, siendo así se debe proceder al tratamiento profiláctico sobre estrategias donde se presenten una prevalencia de 0 o igual al 20% donde el tratamiento consistirá en tres aplicaciones del tripanocida.

En estudios realizados por Aguilar, 1996, la primera dosis se aplicará al inicio de la época de lluvias, la segunda en el medio y la tercera al final de la época de lluvias. Obteniendo así una gran protección contra la enfermedad en el período de gran concentración de tábanos, disminuyendo el riesgo de proliferación de la tripanosomiasis entre los animales.

Estimaciones económicas efectuadas en el Pantanal de Brasil y Bolivia, sobre el control de la tripanosomiasis bovina, han demostrado que cuando se hace el tratamiento en animales de regiones de riesgo o contaminadas, hay un costo o pérdida estimada del 4% de una vaca, y en lugares donde los casos de enfermedad transcurre sin tratamiento, la tripanosomiasis estimada sube a un 17% del valor de una vaca (Seidl y col., 1999).

## **IV. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1.- MATERIAL**

#### **4.1.1. LOCALIZACIÓN DEL ÁREA**

El presente trabajo de investigación se realizó en propiedades ganaderas en la provincia de Yacuma del departamento del Beni, Bolivia.

La provincia de Yacuma está situada geográficamente entre los 17°47' de latitud Sur y los meridianos 63°09' de longitud Oeste y tiene una altitud de 155 msnm. Tiene un clima cálido, tropical, húmedo cuya temperatura media anual es de 27,9 °C, y la humedad relativa del 90% y una precipitación pluvial de 1200mm. Posee una superficie territorial de 20.897 km<sup>2</sup>. Y tiene los siguientes límites:

- ✓ Al Norte con la provincia Vaca Diez
- ✓ Al Sur con la provincia Moxos
- ✓ Al Este con las provincias Mamoré y Moxos
- ✓ Al Oeste con la provincia Ballivián

La provincia de Yacuma se divide en dos secciones territoriales: La primera tiene por capital a Santa Ana de Yacuma, que al mismo tiempo es capital de la provincia. La segunda sección es Exaltación.

#### **4.1.2.- UNIDAD DE MUESTREO**

Se tomaron 150 muestras de la localidad de Yacuma, la cual se dividió en cuatro estratos geográficos, para cubrir de manera completa y homogénea el área de muestreo.

Las propiedades a muestrearse fueron seleccionadas al azar, basados en la lista de socios manejada en la asociación de ganaderos de la provincia. Finalmente los animales a muestrearse se tomaron al azar.

## **4.2. MÉTODOS**

### **4.2.1.- MÉTODOS DE CAMPO**

Los tipos de muestras fueron: - sangre completa; obtenida directamente de la oreja del animal, para la preparación de frotis y para los tubos capilares que se utilizan para las pruebas de centrifugación de microhematocrito, para el diagnóstico de tripanosomiasis in situ, - sangre completa con anticoagulante obtenida de la vena coxígea del animal, en tubos Vacutainer; que se utilizan para la preparación de gotas de sangre en papel filtro y fueron embebidos en acetona para su fijación, para luego hacer el diagnóstico mediante el método de PCR.

### **4.2.2.- MÉTODOS DE LABORATORIO**

#### **4.2.2.1. MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO**

Los métodos que se emplearon para el diagnóstico e identificación de especies de tripanosomas fueron, el método de centrifugación de microhematocrito a realizarse in situ, y observación de frotis de sangre, teñidos con coloración Giemsa.

#### 4.2.2.2. MÉTODO DE DIAGNOSTICO DE PCR

##### 4.2.2.2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN DE LAS GOTAS DE SANGRE EN PAPEL FILTRO

La extracción del ADN para el posterior proceso de amplificación mediante la prueba de PCR se realizó basada en el método descrito por Boid y col.(1999), el procedimiento es el siguiente: Se colocan las muestras del papel filtro de 6mm de diámetro en los tubos eppendorf y se adiciona 200 microlitros de agua destilada. Se incuban los tubos en el termociclador a 37° C, durante 30 minutos. Luego se llevó a la centrífuga durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante. Se colocó los tubos nuevamente 100 microlitros de agua destilada y se llevó al termociclador a 99,9 °C, durante 30 minutos. Se centrífugo durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante, y se lo transfirió a otros tubos eppendorf.

##### 4.2.2.2.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para la amplificación del ADN específico de *T. vivax* y/o *T. evansi* se utilizaron los siguientes primers. Primers específicos para *T. vivax* producto amplificado de 400bp (Masake y col., 1997).

TWJ1        5`CAG CTC GGC GAA GGC CAC TTG GCT GGG

TWJ2        5`TCG CTA CCA CAG TCG CAA TCG TCG TCT CAA GG

Para *T. evansi* se utilizarán Primers de *T. brucei*.- Producto amplificado de 177 bp (Artama y Col, 1992).

TBR1        5`CGA ATG AAT AAT AAA CAA TGC GCA GT

TBR2        5`AGA ACC ATT TAT TAG CTT TGT TGC

Las condiciones para la elaboración del método de PCR fueron las condiciones utilizadas en el LIDIVET, empleando los Primers TWJ ½ a una concentración de 2 micromolar y los Primers TBR1/2 a una concentración final de 0,4 *um* de volumen. Se preparó la solución de PCR, adicionando a los ready To Go-beads, agua, los Primers y la muestra extraída de ADN y se adicionaron las muestras a temperatura de 4 °C. Se llevaron los tubos de PCR al termociclador con los respectivos programas:

***Para el T. vivax***

T°	Tiempo(min.)	
94 °C	3	Incubación inicial
94 °C	1	Desnaturalización
55 °C	2	Hibridación
72 °C	2	Extensión
72 °C	5	Incubación final

**Para el T. evansi**

T°	Tiempo(min.)	
94 °C	3	Incubación inicial
94 °C	1	Desnaturalización
55 °C	1	Hibridación
72 °C	1	Extensión
72 °C	5	Incubación final

**4.2.2.2.3. ELECTROFORESIS**

Procedimientos:

Se prepa gel agarosa al 1.5%, con Tris Acetate EDTA (TAE 10x)

Se cargo las muestras en el gel, con Loading Buffer y se tiño el gel con bromuro de etidio.

Luego se procedió a realizar la electroforesis durante 30 minutos y se hizo la lectura en luz ultravioleta.

### **4.3. ANÁLISIS DE DATOS**

Los análisis de datos se realizaron basados en los resultados obtenidos mediante los métodos parasitológicos y de PCR. El cálculo de prevalencias y la respectiva comparación de proporciones se llevó a cabo mediante el análisis estadístico de Chi Cuadrado y prueba exacta de Fisher usando el programa de computadora Epi Info 6.

## **V. RESULTADOS**

### **5.1. EVALUACIÓN DE LOS PRIMERS Y CONTROLES DEL MÉTODO DE PCR**

Al emplear los primers TWJ1/2 y TBR1/2 en controles de ADN para *T. vivax* y *T. evansi* se pudo observar productos de PCR, los cuales certificaron la validez de la prueba. Cuando se utilizó set de primers de TWJ1/2 con controles ADN de *T. vivax* y *T. evansi*, solo se observó una banda de 400pb, con el control ADN *T. vivax* no se encontraron productos de PCR con el control de *T. evansi*. Mientras que al utilizar el set de primers TBR1/2 tan solo se observó una escalera de 170pb. Con el control ADN *T. evansi* y no observaron productos de PCR con el control de *T. vivax*.

## **5.2. DIAGNÓSTICO DE LA TRIPANOSOMIASIS MEDIANTE MÉTODOS PCR Y PARASITOLÓGICOS**

En el presente trabajo se pudieron identificar animales positivos a la tripanosomiasis con el método de PCR, mientras que todas las muestras resultaron negativas con los métodos parasitológicos (centrifugación de microhematocrito y frotis sanguíneo). De un total de 150 muestras obtenidas a campo y procesadas por los diferentes métodos de diagnóstico, se obtuvieron los siguientes resultados: por el método de PCR resultaron 7 muestras positivas a *T. vivax* (4,66%), con la misma técnica, 2 muestras positivas para *T. evansi* (1,33%)(Gráfico#1).

## **5.3. CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS PARASITOLÓGICOS Y EL PCR**

No se logró realizar evaluaciones de concordancia mediante análisis kappa, entre los métodos de diagnóstico empleados en este estudio, debido a que no se identificó ninguna muestra positiva con los métodos parasitológicos (centrifugación de microhematocrito y frotis sanguíneo).

## **5.4. PREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMIASIS BOVINA**

A través del presente estudio se determinó la presencia de tripanosomiasis bovina en la provincia de Yacuma. Las especies detectadas mediante la prueba de PCR fueron *T. vivax* y *T. evansi*.

Considerando que la identificación del parásito por métodos parasitológicos tanto como su ADN (PCR), son indicativos que existe una infección activa, se reporta la prevalencia en base a los resultados positivos obtenidos solo por PCR.

De acuerdo al siguiente cuadro, se pueden observar las prevalencias obtenidas en las diferentes pruebas; mediante el método de PCR *T. vivax* se determinó una prevalencia de 4,66%(I.C. 1,89-9,37), para PCR *T. evansi* 133%(I.C. 0,16-4,73), no habiéndose observado diferencia significativa ( $P>0,05$ ), en las prevalencias obtenidas con las diferentes pruebas.

## 5.5. FACTORES DE RIESGO DE LA TRIPANOSOMIASIS

Tomando en cuenta la raza, por la prueba de PCR *T. vivax*, de los 128 animales mestizos el 3,91% resultó positivo (5/128), mientras que en los criollos el 9,10% resultó positivo (2/22). En la prueba de PCR *T. evansi* los mestizos tuvieron positivos el 1,56% (2/128), y en los criollos todos negativos (0/22). Según los resultados obtenidos en las distintas pruebas no se encontró diferencia significativa entre las razas ( $P>0,05$ ) (Gráfico #2).

Buscando evaluar el sexo como un factor de riesgo para la tripanosomiasis se observó que por el método de PCR *T. vivax* del total de 145 hembras resultó el 4,83% positivo (7/138) y ningún macho positivo (0/5), mediante PCR *T. evansi* el 1,38% de las hembras fueron positivas (2/143). No se observó diferencia significativa entre las prevalencias por sexo ( $P>0,05$ )(gráfico #3).

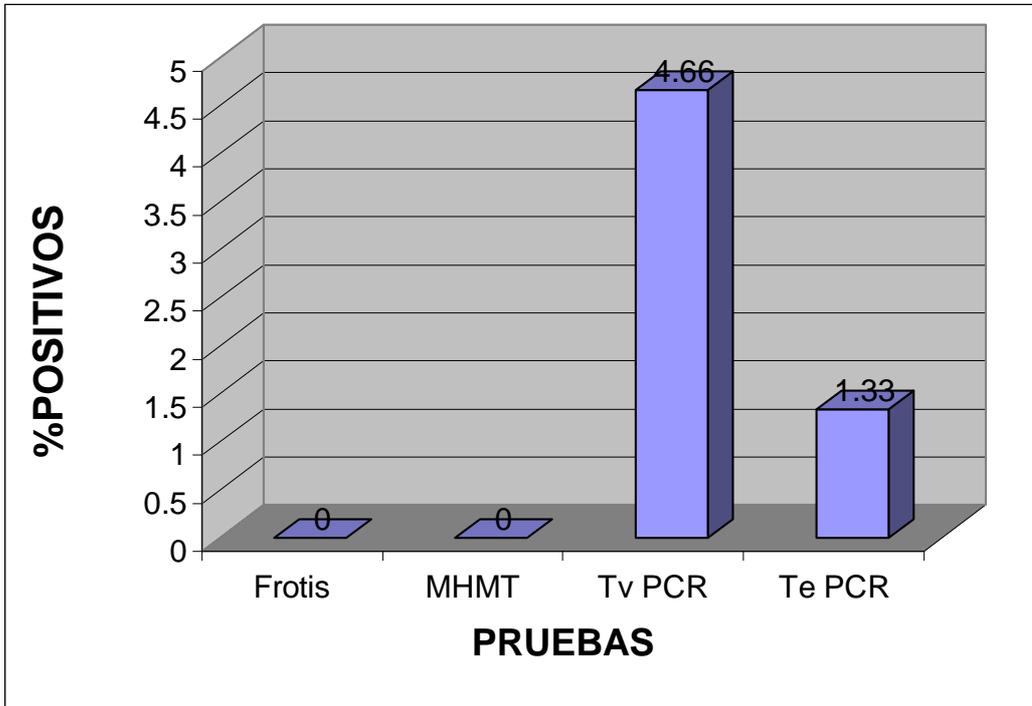
Finalmente se evaluó la proporción de animales positivos y negativos a tripanosomiasis en distintos estratos basados en la edad de los animales buscando identificar al factor edad como un factor de riesgo. Mediante la prueba PCR *T. vivax* se obtuvieron los siguientes resultados; en el grupo de animales menores de 24 meses no hubieron positivos (0/11), de 25 a 48 meses el 4,55%

fue positivo ( 1/21), mayores de 48 meses el 5,13% resultó positivo (6/111), no se observó diferencia significativa entre los positivos de las diferentes edades ( $P>0,05$ ). Para la prueba de PCR *T. evansi* en los animales de 24 meses no hubieron positivos (0/11), en los de 25 a 48 meses el 4,55% fue positivo (1/21) y en los mayores de 48 meses el 0,85% resultó positivo (1/116), no habiendo diferencia significativa entre las prevalencias de *T.evansi* por edad ( $P>0,05$ ). (Gráfico # 4)

## **GRÁFICO N°1**

### **PROPORCIÓN DE POSITIVOS ENCONTRADOS**

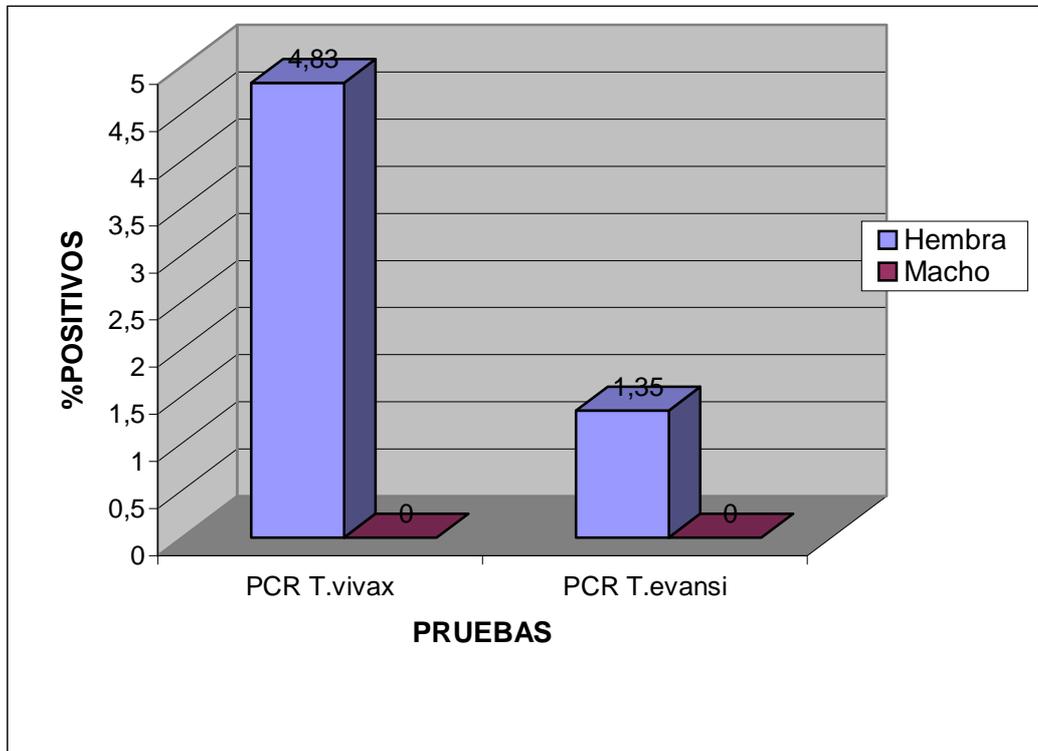
#### **EN LAS DIFERENTES PRUEBAS**



**GRÁFICO N°2**

**PROPORCIÓN DE ANIMALES POSITIVOS A TRIPANOSIOMASIS**

**POR SEXO**

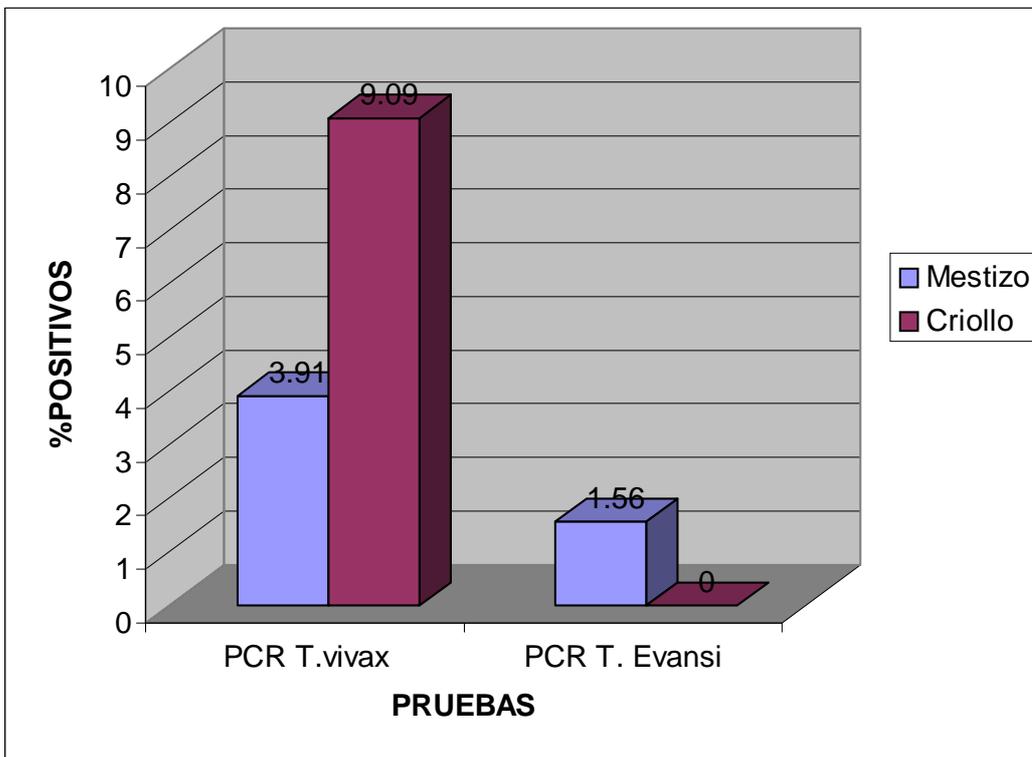


P>0,05

### GRAFICO N°3

**PROPORCION DE ANIMALES POSITIVOS A TRIPANOSIOMIASIS**

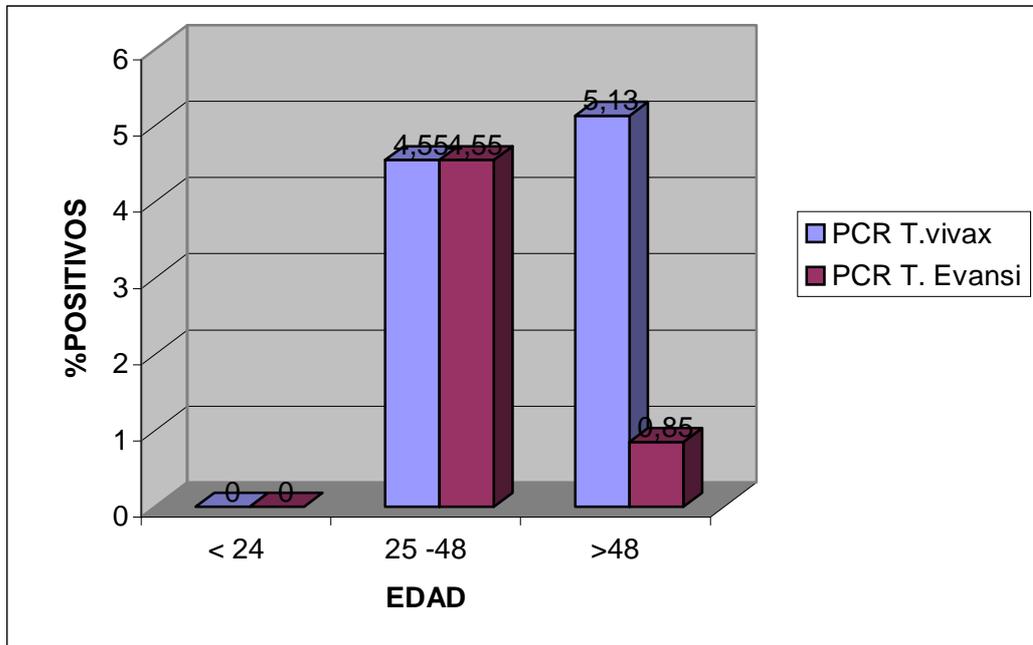
**POR RAZA**



**GRAFICO N°4**

**PROPORCION DE ANIMALES POSITIVOS A TRIPANOSOMIASIS**

**POR EDAD**



## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la especificidad del PCR, en la identificación y diferenciación de las especies *T. vivax* y *T. evansi*. Se utilizaron dos sets de primers TWJ1/2 y TBR1/2, para la amplificación de ADN de *T. vivax* y *T. evansi* respectivamente. Cuando se emplearon los primers TWJ1/2 en controles ADN

para *T. vivax*, éstos lograron amplificar una banda de 400pb, los que no produjeron ningún producto de PCR cuando se los usó en *T. evansi*.

Esta elevada especificidad para la identificación del *T. vivax* con los primers TWJ1/2 fue reportado por Masake y col.,(1999) empleando cepas de *T. vivax* Colombianas y Africanas solo logró amplificar el ADN de éstas cepas y no se obtuvieron productos de PCR cuando aplicó éstos primers en ADN de otras especies de tripanosomas.

Los primers TBR ½ utilizados en controles de ADN para *T. evansi* lograron amplificar una banda de 177pb, que no produjeron ningún producto de PCR cuando se usaron con controles de *T. vivax*, los primers TBR1/2 empleados a partir de ADN nuclear de *T. brucei* amplifica tanto ADN de éste tripanosoma como de *T. evansi* por lo tanto no se puede diferenciar entre éstos dos parásitos como fue reportado por Artama y col.,(1992).

Debido a la ausencia de *T. brucei* en América del Sur se utilizaron éstos primers como control para *T. evansi*, si hubiera estado presente el *T. brucei* en nuestro continente se tendría que utilizar los primers que detectan el KADN (ADNkinetoplástico), del parásito, los cuales son específicos para cada tripanosoma, pero éstos primers kinetoplásticos tienen que ser evaluados en las cepas de Bolivia, ya que no se tiene información si éstas cepas poseen kinetoplasto o son akinetoplásticas. Ventura y col. (2000) empleó primers kinetoplásticos en cepas de *T. evansi* brasileñas, el mismo reportó el fracaso de éstos primers en la amplificación de ADN de la cepa, demostrando junto a otros estudios morfológicos el estado akinetoplástico de la cepas de *T. evansi* en Brasil.

Los resultados obtenidos en el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina con el método parasitológico y con el método de PCR, nos demuestran la mayor sensibilidad para éste último ya que se detectaron positivos a *T. evansi* y positivos a *T. vivax*, mientras que con el frotis sanguíneo y el microhematocrito todas las muestras dieron negativas. También Masake (2002), reportaron una sensibilidad

de éste método de hasta un 93% mediante estudios en animales infectados en laboratorio.

El presente estudio confirma que la Tripanosomiasis bovina, es endémica en la provincia de Yacuma, la prevalencia obtenida de 4,66% demuestra que es una zona de alto riesgo al igual que otras zonas como la provincia de Guarayos en el departamento de Santa Cruz que tuvo una prevalencia del 4,8% según Braga 2002 y Rodríguez 2003.

Se observó que tanto la raza como el sexo de los bovinos, no tiene ningún efecto en el nivel de infección de los animales, no se obtuvieron diferencias significativas.

Con éste estudio también se puede ver la necesidad de realizar estudios epidemiológicos, clasificar las cepas de tripanosomiasis que hay en Bolivia y secuenciarlas para elaborar primers con la secuencia del genoma de cepas ya clasificadas en las distintas regiones de Bolivia, obteniendo así resultados más precisos con el método de PCR para el diagnóstico de la tripanosomiasis.

## VII. CONCLUSIÓN

Basados en los métodos que fueron realizados en este trabajo, la técnica de PCR certificó la presencia de la infección causada por el *T. vivax* y el *T. evansi* en la provincia de Yacuma departamento del Beni.

Al aplicar el método de PCR en muestras de campo, nos demostró una mayor sensibilidad y especificidad comparado con los métodos parasicológicos

(centrifugación de microhematocrito y frotis sanguíneo), al identificar muestras positivas de *T. vivax* y de *T. evansi* que las pruebas parasitológicas dieron negativas.

## VIII.-BIBLIOGRAFIA

**AGUILAR, M.S.S.R. 1996.** Trypanosomose bovina por *Trypanosoma vivax* na Bolívia; Propostas para o controle e estudos Epizootiológicos. Corumbá, Brasil, Embrapa informe técnico, 1-24.

- AGUILAR, M.S.S.R. 1996.** *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*: Biología, Epizootiología y Métodos Diagnósticos. Corumbá – Brasil, 1 – 80.
- AGUILAR, S.L.A. 1998.** Prevalencia de la Tripanosomiasis en el ganado bovino de la provincia Velasco, Departamento de Santa Cruz. Tesis de Grado de la U.A.G.R.M. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia, 4 -78.
- BORST, P.; FASE FOWLER, F. Y GIBSON, W. C. 1987.** Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol. Biochem. Parasitology*, **23**: 31 - 38.
- DESQUESNES, M. 1997.** Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosomas vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen – enzyme – linked immuno sorbent assay. *Acta Tropica* **65**: 139-148.
- DIRIE, M.F.; OTTE, M.J.; THALTHI, R. Y GARDINER, P.R. 1993.** Comparative studies of *Trypanosoma ( Duttonella) vivax* isolates from Colombia. *Parasitology* **106**: 21-29.
- EISLER, M.C.; LESSARD, P.; MASAKE, R.A.; MOLOO, S.K. Y PEREGRINE, A.S. 1998.** Sensitivity and specificity of *trypanosoma congolense* and *trypanosoma vivax* infection in cattle. *Veterinary Parasitology* **79**: 187-201.
- ENGLUND, P.T.; GUILBRIDE, D. L.; HWA, K. Y.; JOHNSON, C.; ROCCO, L.J. Y TORRI, A.F. 1996.** Kinetoplast DNA, structure and replication. In. SMITH, D.F. Y PARSONS, M. *Molecular Biology of Parasitic Protozoa*. IRL Press, Oxford. pp. 75 - 114.
- GIBSON, W.Y STEVENS, J., 1999.** Genetic exchange in the Trypanosomatidae. *Advances in Parasitology*, **43**: 1-45.
- GONZALES, J.L. 2002.** Evaluation of a Polymerase Chain Reaction assay for the diagnosis of bovine Trypanosomiasis and epidemiological surveillance in

Bolivia. Tesis para optar al grado de Maestro en ciencias. *Centre for Tropical Veterinary Medicine*. University of Edinburgh, Reino Unido.

**HALL, M.; CHAINEY, J.; BETELLA, P. Y ARAMAYO, J.L. 1993.** *Tabanidae* of Santa Cruz, Bolivia, and their role as pests of livestock. The Natural History Museum, UK, Final Report on ODA Animal Health Programme, Project R5407.

**HALL, M. 2001.** Incrimination of vectors of *Trypanosoma vivax* in the new outbreak zone of Santa Cruz, Bolivia. Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh. Project completion summary on the Animal Health Research Programme, Project R7356.

**HOARE, C.A. 1972.** *The Trypanosome of Mammals. A zoological Monograph.* Blackwell Scientific Publication. Oxford.

**JONES, W.T. AND DAVILA, A.M.R. 2001.** *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Trends in Parasitology* **17** (2): 99-101.

**LEVINE, N.D. 1983.** Tratado de Parasitología Veterinaria. Traducido del Ingles por Tarazona, V.J. Ed. Acribia. Zaragoza , España, pp. 14 - 17.

**JONES Y MCKINNELL.1985.** Antigenic. Variation in *Trypanosome evansi*, Isolation and characterization of variable antigen type populations from rabbits infected with a stocks of *Trypanosome evansi* Trope medicine parasitology Ageney, Bélgica.pp.237-241.

**LUCKINS, A.G., 1977.** Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme – linked immunosorbent assay. *Tropical Animal Health and Production* **9**: 53-62.

- MASAKE, R.A.; NJUGUNA, J.T.; BROWN, C.C. Y MAJIWA, P.A. 2002.** The Application of PCR – ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock. *Veterinary Parasitol* **105** (3): 179-189.
- MASAKE, R.A.; NANTULYA, V.M.; PELLE, R.; MAKAU, J.M.; GATUO, H. Y OLE-MOIYOI, O.K. 1994.** A species-specific antigen of *tripanosoma ( Duttonella ) vivax* detectable a the course of infection is encoded by a differentially – expressed tandemly – reiterated gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* **64**: 207-218.
- MASAKE, R.A.; MAJUWA, P.A.; MOLOO, S.K.; MAKAU, J.M.; NJUGUNA, J.T.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLE – MOI JOI. Y NANTULYA, V. 1997.** Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the Polymerase Chain Reaction. *Experimental Parasitology* **85**:193-205.
- MERCK, C. Y COL. 2000.** El Manual Merck de Veterinaria. 5ª ed. Océano. Barcelona, España , pp. 92-96.
- MORLIS, I.; RAVEL, S.; GREBAUT, P.; DUMAS, V. and CUNY, G. 2001.**New molecular marker for *Trypanosome (Dutonella) vivax* identification. Acta Tropical. Nigeria, Africa. Pp. 207-213.
- NANTULYA, V.M. 1990.** Tripanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Revue Scientifique Technique. Office International des Epizooties* **9**: 357-367.
- NORMAN, D.L. 1983.** Tratado de Parasitología Veterinaria. Traducido por Tarazona, J.M. Ed. Acribia. Zaragoza, España, pp. 14-17.
- QUIROZ, R.H. 1989.** Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. 3ª Ed. Limusa. México, pp. 70-87.

**RHONE MERIEUX. 1995.** Trypanidium, un avance de la quimioprofilaxis. Rhone Merieux. Colombia, S.A. Santa Fé de Bogotá, 1-12.

**SILVA, R.A.M.S.; DA SILVA, J.A.; SCHNEIDER, R.C., DE FREITAS, J., MESQUITA, D.P.; MESQUITA, T.C.; RAMÍREZ, L.; DÁVILA, A.M. R. Y PEREIRA, M.E.B. 1996.** Outbreak of Tripanosomiasis Due to *Trypanosoma vivax* ( Zieman, 1905 ) in bovines of the Pantanal, Brasil. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, **5**: 561-562.

**SILVA, R.A.M.S.; EGUES,A.; MORALES,G.; EULERT,E.; IBANEZ,R.; MONTENEGRO, A.; SEIDL, A.; DAVILA, R.A.; Y RAMIREZ, L. 1998.** Bovine trypanosomiasis in Bolivian and Brazilian Lowlands. *Memorias instituto Oswaldo Cruz* **93**(1): 29-32.

**SMITH, H.A. Y JONES, T.C. 1987.** Patología Veterinaria. Cap. XII Enfermedades debidas a los protozoários; Tripanosomiasis. Traducción de la 2ª edición en inglés por Chavarria, CH.M. Ed. Uteha. México, pp. 481-485.

**SOULSBY, E.J.L. 1987.** Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. 7 Ed. Interamericana. México-México, pp.513-544.

**TIZARD, I. 1995.** Inmunología Veterinaria. 4 ed. Interamericana. México, pp. 344-352.

**VENTURA, R.M.; TAKATA, C.S.A.; SILVA, R.A.M.S.; NUNES, V.; TAKEDA, G. Y TEIXEIRA, M. 2000.** Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *The Journal of Parasitology*, **86** (6): 1289-1298.

**VENTURA, R.M.; PAIVA, F.; SILVA, R.A.M.S.; TAKEDA, G.; BUCK, G. A. Y TEIXEIRA, M.M. 2001.** *Trypanosoma vivax*: characterization of the

spliced-leader gene of a Brazilian stock and species – specific detection by PCR amplification of and intergenic spacer sequence. *Experimental Parasitology*, **99**: 37-48.

**VENTURA, R.M.; TAKEDA, G.F.; SILVA, R.A.M.S.; NUNES, V.L.B.; BUCK, G.A. Y TEIXEIRA, M.M. 2002.** Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species – specific diagnosis. *International Journal for Parasitology*, **32**: 53-63.

**WELLS E.A; BETANCOURT, A. Y RAMIREZ, L.E. 1982.** Revista Mundial de Zootecnia; *Tripanosoma vivax* en Colombia – Epidemiología y repercusión, F.A.O. Julio – Septiembre, 17-23.