

**EVALUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DE LA TRIPANOSOMIASIS
BOVINA EN EL PANTANAL DE SAN MATÍAS.
(En el Municipio de San Matías, Provincia Ángel Sandoval,
Departamento de Santa Cruz)¹**

Miranda M.², Gonzales J.L.³

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

II.- RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio epidemiológico de la Tripanomiasis Bovina, mediante métodos de diagnósticos parasitológicos y PCR y determinar la prevalencia de la enfermedad en el Pantanal de San Matías. Se tomaron 181 muestras al azar, las cuales fueron procesadas en el LIDIVET, mediante los métodos parasitológicos identificándose 17 muestras positivas (9,39%) para *T. vivax*, mientras que no se identificó *T. evansi*. En el método de PCR para *T. vivax*, utilizando el primer TWJ resultaron 21 muestras positivas (11,6%) y utilizando el primer TVW resultaron 28 muestras positivas (15,47%) para *T. vivax* y con el primer TBR para *T. evansi* resultaron 2 muestras positivas (1,1%). Mediante análisis Kappa, el método de PCR obtuvo una concordancia significativa con los métodos parasitológicos. Considerándose como animal infectado o positivo, toda muestra que sea positiva en cualquiera de las pruebas, la prevalencia estimada para *T. vivax* fue un total de 18,23% y para el *T. evansi* fue un total de 1,11%. Buscando identificar algunos factores de riesgo de la enfermedad se pudo observar que de acuerdo al sexo no exista diferencia significativa ($P>0,05$) entre hembras y machos y por el contrario se observó diferencia significativa ($P<0,05$) en los animales mayores de 24 meses con los menores de 24 meses, de acuerdo a la raza se observaron diferencias significativas ($P<0,05$) entre los animales Mestizos y Nelore con Europeo. En el presente estudio se certificó la presencia de la enfermedad en el Pantanal de San Matías presentándose de una forma endémica y preocupante.

¹ Tesis de Grado presentada por Miranda Marcos, para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista.

² Calle Madrina de Guerra # 11 Santa Cruz – Bolivia.

³ Médico Veterinario Zootecnista, Titular del Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario - LIDIVET, Santa Cruz – Bolivia.

III.- INTRODUCCIÓN

La presente investigación se realizó como un aporte al estudio de la tripanosomiasis bovina en nuestro medio, considerando la importancia que ha llegado a alcanzar en países de la América del Sur, como es el caso de Bolivia, principalmente en las zonas tropicales pantanosas; zonas que son el medio adecuado para la proliferación de los vectores de la enfermedad.

La tripanosomiasis en el ganado bovino es una parasitosis hemática es patógena dependiendo de la especie que ataque a estos, si es ***T. vivax***, que es altamente patógeno ocasiona una considerable mortalidad y los que no mueren padecen de un enflaquecimiento progresivo quedando en estado crónico como portadores, haciendo que se difunda cada vez más la enfermedad. En otros tipos de tripanosomiasis, el bovino padece en forma leve o actúa como portador, por ejemplo el ***T. evansi*** (Levine, 1983; Boero, 1976).

La tripanosomiasis en Bolivia es un riesgo potencial para más de 7 millones de Bovinos en el país, de los cuales 243.967 cabezas son la población bovina en riesgo en la provincia Ángel Sandoval.

La tripanosomiasis en América del Sur, fue reportada por primera vez por Leger y Viene 1919, en la Guayana Francesa. Desde entonces la enfermedad se diseminó en el continente, llegando a Brasil y luego a las tierras bajas de Bolivia. Se cree que el ***T. vivax*** hubiese llegado al departamento de Santa Cruz, mediante bovinos infectados provenientes del norte del pantanal de Brasil.

La tripanosomiasis bovina fue diagnosticada por primera vez en Bolivia, entre enero y marzo de 1996, en la provincia de Chiquitos, departamento de Santa Cruz. Luego se diseminó a otras provincias Velasco, Guarayos, Sara, Ñuflo de Chávez, siendo atribuida al movimiento de ganado en el departamento y a la presencia de altos números de vectores de la enfermedad (Silva y col. 1998).

Estudios realizados en el departamento de Santa Cruz, demuestran que la época de lluvia representa el periodo de mayor riesgo para la transmisión de la tripanosomiasis, debido a la abundancia de tábanos, los vectores mecánicos de la enfermedad (Hall y col. 1993; 2001).

El diagnóstico de la tripanosomiasis está basado principalmente en métodos parasitológicos, los cuales tienen una baja sensibilidad, de modo que no detectan animales infectados con niveles bajos de parasitemia. Los métodos serológicos también son empleados en el diagnóstico de la tripanosomiasis, pero estos, también reportaron problemas de sensibilidad y especificidad (Desquesnes, 1997; Eisler y col. 2001).

Recientemente los métodos de diagnóstico molecular, tales como, Reacción en Cadena de la Polimerasa, (PCR), traen la respuesta a los problemas de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la tripanosomiasis, presentes en métodos parasitológicos y serológicos.

Esta técnica molecular, ofrece la oportunidad de realizar estudios más precisos, con resultados satisfactorios sobre la presencia de los tripanosomas en Bolivia. Estos datos son necesarios para el desarrollo de estrategias de control eficaces contra estos parásitos. Debido a que la presencia de los mismos conduce a una considerable sub-explotación de los

recursos naturales y un bajo nivel de producción animal, analizando estos factores, es de vital importancia encarar el problema basándose en estudios sistematizados que nos brinden un conocimiento satisfactorio, tanto de la extensión como del impacto de la infestación en la ganadería regional.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) Determinar la presencia de ADN del ***Tripanosoma vivax*** y ***Tripanosoma evansi*** mediante la prueba de PCR. b) Determinar la prevalencia de la tripanosomiasis bovina mediante las técnicas de PCR y parasitológica y comparar los resultados obtenidos con estas técnicas.

IV.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1- TRIPANOSOMIASIS

4.1.1.- DEFINICIÓN

Tripanosomiasis es un término colectivo que se aplica a un grupo de enfermedades del hombre y de los animales, producidas por una o más especies de protozoarios parásitos unicelulares pertenecientes al género *Tripanosoma*. La tripanosomiasis bovina es una enfermedad infecciosa del ganado provocada por uno, o más, de los siguientes tripanosomas: ***Tripanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. brucei***. También se ha encontrado en el ganado ***T. simiae* y *T. uniforme*** (Asoc. Vet. Británica, 1966).

Es la enfermedad parasitaria, causada por el ***T. vivax***, más importante del ganado vacuno, en el oeste de África, transmitida por las moscas tsetsé (glossina), en la América del Sur transmitida por vectores mecánicos hematófagos los tábanos (Hall y col. 1993; 2001).

Es una enfermedad progresivamente anemizante y debilitante, disminuyendo severamente la producción tanto de leche como de carne, pudiendo llevar a la muerte.

La enfermedad parasitaria, causada por el ***T. evansi***, afecta principalmente a caballos, burro, cabra, ovino, camello, cerdo, perro, búfalo de agua, elefante, capibara, coatíes 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, conocida con el nombre de surra o el mal de la cadera en los equinos (Merck, 2000).

4.1.2.- HISTORIA

En 1880, Evans descubrió en la India que la Surra del caballo y del camello es producida por ***T. evansi***. Muchos tiempo después, Bruce (1894) atribuyó la nagana de los équidos y los bóvidos del África Central a una causa semejante y al mismo tiempo demostró la intervención de la mosca Tse-tsé en la transmisión natural del ***T. vivax***. En el mismo año demostró Rouget, que también es tripanosoma el agente de la durina y por último Elmassian (1901) probó lo mismo para el mal de caderas en équidos de América del Sur (Descrito por Hoare, 1972).

El ***T. vivax*** fue reportado en Sudamérica desde 1919 (Leger y Viene, 1919) y en Bolivia desde 1996 (Silva y col, 1998). En Bolivia los primeros brotes de la enfermedad fueron en el Departamento de Santa Cruz. Los primeros casos fueron detectados por LIDIVET entre Enero y Marzo de 1996 en la Laguna Concepción (Provincia Chiquitos) en animales procedentes del norte del Pantanal brasileño. Otros brotes de esta enfermedad aparecieron posteriormente en las provincias de Ñuflo de Chávez y Guarayos. Tanto ***T. vivax*** como ***T. evansi*** fueron identificados durante estos brotes, con casos clínicos severos en las granjas afectadas. Posteriormente brotes de tripanosomiasis fueron reportados y confirmados por diagnóstico parasicológico en regiones cercanas a Santa Cruz de la Sierra e incluso en el departamento de Beni (Aguilar Machado y Rivera Dávila, 1997, Cuellar y Carrique, 1998).

4.1.3.- TAXONOMÍA

Phylum-----	<i>Sarcomastigophora</i>
Subphylum-----	<i>Mastigophora</i>
Clase-----	<i>Zoomastigophorea</i>
Orden-----	<i>Kinetoplastida</i>
Familia-----	<i>Trypanosomatidae</i>
Género-----	<i>Trypanosoma</i>

Phylum Sarcomastigophora: Con flagelos, pseudópodos o ambos, núcleo único, generalmente no forman esporas, reproducción sexual si existe, básicamente síngamia

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 esta constituido por un blefaroplasto 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 tripanosomas, recorre la longitud total del cuerpo.

Familia Trypanosomatidae; Con forma de hoja, pueden ser redondeadas.

Género Trypanosoma; Los miembros de este género se presentan en vertebrados, principalmente en la sangre y tejidos fluidos, aunque unos pocos pueden invadir células tisulares. Son transmitidos por artrópodos hematófagos, en los que se desarrollan las fases evolutivas de; trypomastigote, epimastigote, promastigote y amastigote. Algunas especies han perdido la capacidad de experimentar desarrollo cíclico en artrópodos, y

la transmisión mecánica es el único medio disponible. En muchas especies en el hospedador vertebrado solo aparecen trypomastigote, que se caracterizan por su especial aptitud patógena para el hombre y los animales. Los protozoos a considerar en el presente estudio son del género ***Trypanosoma***, subgénero ***Duttonella*** especie ***T. vivax*** y subgénero ***Trypanozoon*** especie ***T. evansi*** (Soulsby, 1987).

SUBGÉNERO *Duttonella*: Kinetoplasto terminal, extremo posterior del cuerpo redondeado, membrana ondulante poco desarrollada muestra gran movilidad, es monomórfico. A este subgénero pertenece la especie ***T. vivax***.

SUBGÉNERO *Trypanozoon*: Monomórfico o polimórfico, en este último caso se presentan formas largas, intermediarias y rechonchas, provistas de un flagelo libre, largo o corto, o carentes de él, respectivamente. Membrana ondulante bien desarrollada, kinetoplasto pequeño y subterminal. A este subgénero pertenece la especie ***T. evansi*** ha dividido el género en dos secciones de acuerdo con el ciclo biológico que cumplen en el vector y en el hospedero (Hoare 1972).

4.1.3.1.- Sección Stercoraria:

Son tripanosomas que se desarrollan en la parte posterior del tracto digestivo de sus vectores y la transmisión generalmente tiene lugar por contaminación de las heces y se transmite por inoculación. El tripanosoma perteneciente a esta sección presente en Bovinos en Sudamérica es el ***T. Theileri***, pero aparentemente este parásito no es patógeno (Hoare, 1964).

4.1.3.2.- Sección salivaria:

Son los que se desarrolla en la probóscide y en las glándulas salivarias, es decir, en la estación anterior de los vectores, y se inyecta con la saliva en el momento de la succión de sangre de sus hospederos definitivos (Hoare, 1972).

Tripanosomas que atacan a los bovinos, Sección Salivaria

Especies	Enfermedad	Huésped definitivo	Huéspedes intermediarios	Distribución geográfica
<i>T. vivax</i>	Tripanosomiasis	Bovino, ovino, caprino, equino, camello.	Mosca tsetsé, (glossina spp.) tábanos	África tropical, América del Sur
<i>T. evansi</i>	Mal de cadera y surra (bovino ninguno).	Equinos, caprinos, ovinos, bovinos son reservorios.	Tábanos y Stomoxys calcitrans	Cosmopolita
<i>T. congolense</i>	Tripanosomiasis	Bovino, equino, caprino, ovino, cerdo, perro y camello.	Mosca tsetsé	África tropical.
<i>T. brucei</i>	Nagana	Hombre, rumiantes domésticos y salvajes.	Mosca tsetsé	África tropical.

(Smith y Jones, 1987; Boero, 1976).

4.1.4.- MORFOLOGÍA Y ESTRUCTURA GENERAL DE LOS TRIPANOSOMAS

Los tripanosomas pueden ser monomórficos, en el que todos sus representantes tienen una morfología similar y constante, con flagelo libre. O también polimórfico, presentando mayores variaciones morfológicas, especialmente en tamaño, posición del núcleo y flagelo libre o no (Boero, 1976).

Los tripanosomas son protozoos provistos de un núcleo, un blefaroplasto y una pestaña o flagelo. Los conocidos como agentes de enfermedades tienen el cuerpo fusiforme, delgado, afilado hacia el extremo anterior y más o menos romo hacia el posterior. Miden generalmente de 21 a 35 *micras* de longitud y de 1,5 a 3 *micras* de ancho. Posee un núcleo esférico u oval en su centro, aproximadamente, un blefaroplasto cerca de su extremo posterior y, junto a este último, a menudo otro núcleo basilar. De este último nace un delgado flagelo que recorre el borde exterior de una membrana ondulosa que se halla en uno de los lados del cuerpo del parásito, se dirige hacia delante y a veces, termina libremente. En el protoplasma se ven distribuidos, además de vacuolas, gránulos de diversos tamaños. Mediante movimientos del flagelo y contracciones espirales, los tripanosomas pueden moverse con vivacidad en los líquidos y entre los glóbulos rojos de la sangre (Levine, 1983; Manninger, 1973).

Estos parásitos están entre los más primitivos de 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 mitocondrias y una de sus más remarcables características es su ADN mitocondrial, conocido como ADN Kinetoplasto (KADN). Contrario a cualquier

otro ADN en la naturaleza, el KADN esta organizado dentro de una red conteniendo varios millares de círculos de ADN ínter ligados topológicamente. Los círculos son de dos tipos, los minicírculos y los maxicírculos (Englund y col, 1996).

Para el suceso en la transformación morfológica de los tripanosomatideos en el vector o cultura, los tripanosomas necesitan tener un kinetoplasto funcional, el cual contiene enzimas y citocromos para la ejecución de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Evidencias en que el kinetoplasto es fundamental para el desarrollo cíclico en el vector, fueron obtenidas en experimentos donde la mosca tsetse fue infectada con *T. brucei*, conteniendo formas akinetoplastidas y formas con kinetoplasto. Resulto que solamente las formas con kinetoplasto sobrevivieron en el vector (Lun y Desser, 1995).

4.1.4.1. Morfología *T. vivax*

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

Estudios Regionales realizados en Brasil y Bolivia demuestran variaciones en el tamaño del *T. vivax* de acuerdo a la localidad encontrada, siendo estas: En Brasil se detecto en Mato Grosso en bovinos el *T. vivax* con una longitud de 11 – 22 *micras*, en 1997 por Dávila, y en Mato Grosso del Sur, con una longitud de 15 – 25 *micras*.

En Bolivia se detecto en Santa Cruz el ***T. vivax*** con una longitud de 12 – 21 *micras*, y también se detecto en Puerto Suárez con una longitud de 15 –20 *micras* (Davila, 1998).

4.1.4.2. Morfología del ***T. evansi***

Miden de 15 a 34 *micras* de longitud y son monomórficos, pero esporádicamente experimentan polimorfismo. Se encuentra en sangre y linfa, tiene forma típica de tripomastigote, comprende formas delgadas e intermedias. Las formas delgadas tienen un largo flagelo libre y el extremo posterior estrecho, el que puede ser redondeado o truncado. El kinetoplasto esta situado a alguna distancia de la punta. Las formas intermedias tienen un flagelo corto, con el extremo posterior frecuentemente puntiagudo y con el kinetoplasto subterminal El kADN de los tripanosomas esta conformado por maxi y minicírculos, con excepción del ***T. evansi***, que no posee los maxicírculos (Borst y col. 1987, Quiroz, 1989; Soulsby, 1987).

Según Lun y Desser (1995), la hipótesis más probable para la ausencia de los maxicírculos en ***T. evansi*** es la siguiente, el ***T. evansi*** tuvo su origen de un mutante del ***T. brucei***, siendo que primero pierde sus maxicírculos durante el proceso de replicación. Probablemente esto ocurrió cuando un minicírculo se libero de la red de ADN y diferente a los demás, este no se recolecto a la red, y durante el proceso subsiguiente de la división celular, una parte de la red en división contenía ambos maxi y minicírculos y la otra contenía apenas los minicirculos. Esta cepa mutante de minicirculos se disemino por África y otras partes del mundo en función de la migración animal.

4.1.5.- IMPORTANCIA DEL KADN Y SU INFLUENCIA EN LA DISTRIBUCIÓN DE LOS TRIPANOSOMAS

Las formas alongadas de los tripanosomas africanos no presentan enzimas del citocromo y tienen un ciclo de krebs funcional, cuando se encuentran en el hospedero mamífero. El *T. evansi* no presenta maxicírculos, pero consiguiese desarrollar en el hospedero mamífero, debido a que las formas sanguíneas no requieren un sistema respiratorio generando ATP. Los tripanosomas con kinetoplasto funcional necesitan desarrollar una serie de transformaciones morfológicas y bioquímicas luego de su ingestión por el vector. Siendo así la distribución geográfica de los tripanosomas depende de la distribución de sus vectores. Como resultado de la pérdida de los maxicírculos y ausencia de transformaciones morfológicas en el vector, la transmisión del *T. evansi* no depende de la distribución del vector y por esta razón varios insectos hematófagos pueden transmitirlo de un mamífero para otro y su distribución es cosmopolita. El *T. brucei* requiere la ingestión de sangre infectada por una mosca tsetse. Después de la ingestión por la mosca el *T. brucei* rápidamente pierde la capacidad de infectar el hospedero mamífero y adentro del tubo digestivo de la mosca, pasa por una serie de alteraciones morfológicas y bioquímicas. La forma metacíclica tripomastigote es el único estágio en el insecto que es infeccioso para los mamíferos. Siendo así el *T. brucei* tiene su distribución geográfica de acuerdo al hábitat de las moscas tsetse, que solamente ocurre en África tropical (Lun y Desser, 1995).

Si bien el mecanismo de adaptación del *T. evansi* ha sido dilucidado, no se conoce todavía el mecanismo de la adaptación del *T. vivax* a transmisión mecánica ya que este parásito posee maxicírculos y minicírculos en su KADN (Gonzales, 2002).

4.1.6.- ECOLOGÍA DE LA VARIACIÓN ANTIGÉNICA

El entendimiento de la variación antigénica requiere informaciones sobre la dinámica y la ecología de los tipos antigénicos variables (VAT, del inglés Variable Antigenic Type). La aparición de VATs es causada por la expresión de diferentes capas de superficie. La capa de superficie es compuesta por una glicoproteína variable de superficie (VSG). Como consecuencia, la sucesión de diferentes VATs es relatada en la expresión consecutiva de VSGs antigenicamente diferentes (Vickerman, 1978; Cross, 1975; Barbet y Mcguire, 1982).

Cuando las moléculas de VSG son expresadas en la membrana de parásitos vivos, no tienen reacciones antigénicas cruzadas, pero cuando estas moléculas son purificadas, una determinante de reacción cruzada es detectada, la cual es localizada dentro del cabohidratocarboxílico terminal, estructura de las moléculas solubles de VSG (Barbet y Mcguire, 1978; Barbet y col, 1981).

La señal que induce la activación de VSG no es totalmente conocido. Variantes antigénicas aparecen en poblaciones de tripanosomas cultivados in vitro, indicando que la presencia de anticuerpos no es requerida para inducir la variación (Doyle y col, 1980).

Además el sistema inmune del hospedero tiene un papel crucial en el establecimiento del modelo de onda de fluctuaciones de parasitemia y en definir la orden de expresión de la variante. La variación antigénica no es un proceso aleatorio y nuevas variantes aparecen en orden imprecisa (Miller y Turner, 1980).

Los tripanosomas expresan normalmente un único gen VSG, más la simultánea expresión de dos genes, resultando la aparición de una capa superficial mixta, ha sido reportado. Estas formas pueden representar formas intermediarias en el proceso de activación de la capa de superficie. Los parásitos metacíclicos en las glándulas salivares son antígenicamente heterogéneos mas expresan un número limitado de VATs. De acuerdo con Gray 1966 diferentes aislados de la misma especie obtenidos en diferentes localizaciones geográficas frecuentemente expresan diferentes repertorios de variantes (Descrito por Aguilar, 1996, Turner y col, 1988, Baltz y col, 1986).).

4.1.7. - BIOLOGÍA DE LOS TRIPANOSOMAS

Exceptuando a unas pocas especies, como el *T. evansi* y *T. equiperdum* y excepcionalmente el *T. vivax*, la mayoría de los tripanosomas experimentan desarrollo cíclico en un artrópodo vector, como la mosca Tsetse. Cuando ocurre una transmisión mecánica, frecuentemente se lleva a cabo por la intervención de moscas picadoras, tales como *Stomoxys* y *Tábanos*. La mosca picadora se infecta inmediatamente después de alimentarse, pero el tripanosoma infectante permanece en las partes bucales del vector mecánico, sólo durante un corto periodo de tiempo, y tienen que ser rápidamente transmitido (Aguilar, 1996).

Es importante distinguir estos dos tipos de transmisión, mecánica y cíclica debido a que en la transmisión mecánica, los tripanosomas infectantes tienen un corto periodo de vivencia en sus vectores, y por el contrario, en la transmisión cíclica el tripanosoma tiene que pasar un tiempo bastante largo para que alcance su fase infectante, que generalmente requiere de 15 a 35 días (Smyth, 1965).

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, a lo largo del eje longitudinal, donde se forma dos células hijas a partir de una célula madre (Soulsby, 1987).

4.2.- EPIDEMIOLOGÍA

4.2.1. DISTRIBUCIÓN

La tripanosomiasis se encuentra muy extendida en África Ecuatorial, pero también se ha extendido a América Central y Meridional. La distribución en Sudamérica del ***T. vivax*** es: Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colombia, Brasil, Bolivia, en estos países se demostró la presencia del parásito por parasitología (Silva y col. 1998). Utilizando como antígeno una cepa de ***T. vivax*** de Sudamérica. Wells y col (1977) demostró anticuerpos en Colombia, Ecuador, Perú, Brasil y Paraguay y los países centroamericanos de El Salvador y Costa Rica. Pero, los métodos de diagnósticos serológicos basados en la detección de anticuerpos no son totalmente específicos y tienen problemas de reacciones cruzadas, en caso de Sudamérica ***T. vivax*** y ***T. evansi***. Por lo tanto los resultados de Wells y col. (1977) no pueden ser tomados como confirmativos de la presencia del parásito en estos países. ***T. evansi*** ha sido reportado en Venezuela, Colombia, Argentina, Bolivia, Brasil y Perú (Hoare, 1965, 1972, Muñoz y Chávez, 2001).

En Bolivia el ***T. vivax*** fue detectado por primera vez, entre enero y marzo de 1996, en la provincia de Chiquitos, departamento de Santa Cruz, luego se expandió a otras provincias como las de Velasco, Guarayos, Sara y Ñuflo de Chávez (Silva y col. 1998).

Un estudio realizado por Jones y col (2000) demostró la presencia de anticuerpos contra *T. vivax* en la provincia de Guarayos y Concepción, reportando seroprevalencias del 50% y 32% respectivamente, utilizando la técnica de ELISA, y no encontraron seroreactores positivos a este parásito en las localidades de Cabezas y San Ignacio. Otro estudio confirmó la presencia de *T. vivax* y *T. evansi* por medio de Frotis sanguíneo y PCR en la provincia de Guarayos (Braga, 2002).

Reportes de focos clínicos de tripanosomiasis causada por *T. vivax* en bovinos ya fueron reportados en las provincias de Ángel Sandoval, Andrés Ibáñez (Carrique Mas y Cuellar, 1998), Warnes y Sara (LIDIVET, 2000, 2002).

4.2.2.- HOSPEDEROS

T. vivax infecta principalmente bovinos, ovinos, caprinos, camellos, caballos y búfalo de agua (Gardiner, 1989) En Sudamérica este tripanosoma infecta principalmente bovinos (Betancourt, 1978), pero también fue encontrado infestando búfalos de agua (Shaw y Lainson, 1972) ovinos (Gardiner y Mahmoud, 1992; LIDIVET) cabras (Kubes, 1944) venados (Dávila y col., 1998). A pesar de que el *T. vivax* esta muy distribuido en el continente, focos en bovinos con enfermedad clínica severa son de carácter esporádico en la región (Betancourt, 1978; Silva y col., 1998). A pesar de que este protozoo fue encontrado en venados, el rol de animales salvajes como reservorios de la tripanosomiasis todavía no ha sido demostrado. Perros son refractarios a este parásito y la mayoría de los intentos para infectar roedores de

laboratorio, utilizando stocks Sudamericanos de *T. vivax* han fracasado (Shaw y Laison, 1972; Dirie y col., 1993).

T. evansi es patógeno en camellos, caballos, búfalo de agua y perros (Lun y col., 1993), pero también puede infectar bovinos, ovinos, caprinos, cerdos y venados. Generalmente la infección en equinos es aguda y de mortalidad elevada, mientras que en bovinos y en búfalos la enfermedad es de curso crónico generalmente asintomático (Gardiner y Mahmoud, 1992); en cerdos puede ser asintomático o presentar una leve sintomatología y cabras experimentalmente infectadas se observó un curso crónico de la enfermedad a veces con sintomatología nerviosa (Zweygarth, 1992). Muestreos epidemiológico realizados en Sudamérica, tanto en animales domésticos como salvajes demostraron la presencia de *T. evansi* en caballos, mulas, perros, coatíes (tejón) y capibaras, siendo estos dos últimos posiblemente potenciales reservorios de la enfermedad, debido a que se determinaron prevalencias de 27% y 58% en capibaras salvajes y en semicautiverio respectivamente; además se reportó un 65% de prevalencias en coatíes muestreados al azar en el pantanal Brasileiro (Stevens 1989; Monzón y col 1984; Nunez y col 1993; Franke y col 1994; Silva y col 1995). Otros animales salvajes que pueden infectarse con *T. evansi* son el ocelote (Shaw, 1977) y el vampiro (Hoare, 1965).

En lo que respecta a Bolivia, se diagnosticaron infecciones mixtas de *T. vivax* y *T. evansi* en bovinos, (LIDIVET, 1998, 2000) de donde nace la importancia aplicar métodos de diagnóstico específicos que permitan diferenciar entre ambos tripanosomas. Tanto coatíes como capibaras son habitantes comunes de los llanos orientales del país, y considerando los altos índices de prevalencia de *T. evansi* reportados en el pantanal brasileiro, podemos considerar que también estos animales juegan un rol de reservorios

de este parásito en el país al igual que el vampiro, el cual esta presente en casi todo el oriente boliviano. Respecto a ***T. vivax***, a pesar de que el parásito fue reportado en venados, la existencia de un reservorio salvaje todavía no se ha demostrado. Esta claro que existe la necesidad de realizar más estudios de incriminación de reservorios salvajes para el mejor entendimiento de la epidemiología de estos parásitos (Gonzales, 2002).

Los hospederos intermediarios como los vectores biológicos son: *glossina spp.*, donde el tripanosoma cumple un ciclo biológico en estos vectores, sirviendo como vector para el ***T. vivax***, pero no así en Sudamérica y Bolivia y los vectores mecánicos como los tábanos y otras moscas picadoras que existen en América Central y del Sur, que sirven como vector para ambos tripanosomas (Noble, 1965; Asoc. Vet. Británica, 1996; La Page, 1971; Levine, 1993; Merck, 1993).

Entre los vectores mecánicos que existen en Bolivia se ha encontrado más de 35 especies de tábanos en Santa Cruz y en Guarayos aproximadamente 23, siendo el más numeroso el *Tabanus occidentales* y molecularmente se identifico el ADN del ***T. vivax*** y ***T. evansi*** en las partes bucales y hemolinfa de este artrópodo. En Bolivia se conocen actualmente 163 especies pertenecientes a 32 géneros distintos (Hall y col., 1993, 2001).

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*, actúa como hospedero y agente transmisor en Centro y Sudamérica (Hoare, 1965). Esto se debe ha que el *T. evansi* no posee en su KADN (ver sección 3.2.6.), Maxicírculos, los cuales son importantes en la activación del mitocondria para

el inicio del ciclo biológico en el hospedero intermediario, las moscas Tsetse (Borst y col, 1987).

4.2.3.- TRANSMISIÓN

Todos los tripanosomas contienen un kinetoplasto que contiene ADN mitocondrial, conformado por maxi y minicírculos (Borst y col., 1987). La presencia de maxicírculos es considerada necesaria para el tripanosoma de la sección Salivaria, por que los maxicírculos son los que activan a la mitocondria para que ocurra el ciclo biológico del parásito en el vector para que el tripanosoma se vuelva infectivo y pueda contagiar al animal. Esta transmisión cíclica, mantendrá la distribución del tripanosoma y permitirá el intercambio genético dentro de las especies (Stevens y Gibson, 1999).

En los tripanosomas de transmisión mecánica no existe el intercambio genético, esto solo ocurre en los tripanosomas de transmisión biológica. Se considera que la transmisión mecánica de ambos parásitos es mantenida principalmente por los tábanos. Hall y col.(1993; 2001), reportó que la estación de mayor abundancia de tábanos está relacionada con las épocas húmedas en las tierras bajas bolivianas y hay una mayor incidencia de la tripanosomiasis en el ganado de mayor edad debido a que estos animales están más tiempos quietos comparados con los animales jóvenes.

La tripanosomiasis en nuestro medio, es transmitida por la picadura de vectores mecánicos hematófagos, principalmente los Tábanos. Un factor esencial de la transmisión mecánica es la alimentación interrumpida de las moscas, que rápidamente buscan un nuevo hospedador, con el fin de saciarse. La transmisión también puede llevar a cabo durante vacunaciones

masivas, cuando se inyectan diferentes animales con agujas posiblemente contaminadas (Wells, y col, 1982; Jones y Davila, 2001, Hall y col. 1993).

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*, actúa como hospedero y agente transmisor en Centro y Sudamérica (Hoare, 1965).

Esto se debe ha que el ***T. evansi*** no posee en su KADN (ver sección 3.2.6.) maxicírculos, los cuales son importantes en la activación de la mitocondria para el inicio del ciclo biológico en el hospedero intermediario, las moscas Tsetse (Borst y col, 1987).

4.5.- SIGNOS CLÍNICOS

La forma aguda se manifiesta repentinamente, enfermando varios animales a la vez, que presentan temperatura elevada, pérdida del apetito, disminución súbita de la producción de leche, anemia intensa, decaimiento y muerte. En la forma crónica se observan enflaquecimiento progresivo, abdomen retraído, arcos costales muy marcados, mirada vaga, ojos hundidos, anemia progresiva y los animales no tratados, difícilmente se recuperan (Smith y Jones, 1987).

En los brotes de ***T. vivax*** reportados en Mato Grosso del Sur, Brasil y Santa Cruz, Bolivia, los bovinos afectados presentaron las tres formas clínicas, la hiperaguda caracterizada por hemorragias y mortalidad. La crónica donde la pérdida de peso y el desarrollo de anemia son los signos principales y la forma subclínica que puede desaparecer sin necesidad de tratamiento.

También se registró la ocurrencia de aborto y cuadros diarreicos (Silva y col. 1998).

La dinámica del comportamiento de la enfermedad fue de 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 (Moisés, 1998).

4.6.-DIAGNÓSTICO

4.6.1.- DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO Y SEROLÓGICO

Los métodos de diagnósticos conumente empleados son el parasitológico y el serológico. Los métodos parasitológicos están basados en la identificación de los tripanosomas durante su fase sanguínea, pero tienen el problema de poseer una baja sensibilidad, no detectando hasta un 50% de animales infectados con baja parasitemia.

Los métodos parasitológicos empleados en América del Sur y especialmente en Bolivia, son importantes en el diagnóstico rápido de la tripanosomiasis, especialmente, cuando ocurren focos de la enfermedad, posibilitando de este modo la reacción inmediata para el control de los focos. Los demás métodos tardarían un poco y tienen un mayor costo, siendo mayormente empleados en estudios epidemiológicos, con una mayor especificidad y sensibilidad en el diagnóstico de la enfermedad. (Gonzales, 2002).

Los métodos serológicos que detectan antígenos, 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 de 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).

4.6.2.- MÉTODO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR (PCR)

Los métodos de diagnósticos moleculares poseen una alta sensibilidad y especificidad, basada en la detección del ADN del parásito. El método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), consiste en la amplificación de material genético (ADN de virus, bacterias, parásitos etc.), con la ayuda de reactivos específicos (Primers), para cada uno de los patógenos, esta basado en la acción de la polimerasa, que es la enzima que dirige la síntesis de ADN.

Las ventajas más significativas de la PCR son: Especificidad, donde se establecen condiciones de la reacción muy estrictas, de manera que sólo se pueda amplificar el microorganismo que estamos buscando detectar.

Sensibilidad, donde permite la detección de cantidades muy pequeñas del material genético buscado, siendo esta una gran ventaja sobre otros métodos (Masake y col. 1997).

El 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).

Artama y col. (1992), desarrollaron Primers que tienen como blanco ADN nuclear de los tripanosomas del subgénero trypanozoon, (TBR1-2), los cuales no diferencian el *T. brucei* del *T. evansi*. También desarrollo Primers que detectan el kADN del *T. evansi* los cuales son específicos de esta especie, y puede diferenciar el *T. brucei* del *T. evansi*. El uso de estos fracasó en las cepas de *T. evansi* de Brasil, ya que estas fueron demostradas ser akinetoplastidas (Ventura y col. 2000).

Primers para el diagnóstico de *T. vivax* fueron desarrollados usando como blanco secuencias de satélites del ADN del parásito específicas del mismo (TVWA/B) (Masiga y col., 1992; 1996) o ADN codificado (TWJ1/2), el cual codifica un gen de un antígeno expresado por *T. vivax* (Tv27) de todas las cepas examinadas provenientes del África y Sudamérica (Masake y col., 1997). Estos últimos primers ya fueron probados en Bolivia en la provincia Guarayos, habiéndose encontrado una buena concordancia entre los resultados obtenidos por PCR y los resultados de parasitología, además PCR pudo identificar animales negativos a parasitología, confirmando de este modo la mayor sensibilidad de este método comparado con los métodos parasitológicos (Braga, 2002).

Estudios realizados en América del Sur, llevaron al desarrollo de Primers para *T. vivax* (Ventura y col. 2001) y *T. evansi* (Ventura y col. 2002). Basados en las secuencias de cepas brasileñas, donde las secuencias blancas de ciertos Primers, fueron demostradas estar presentes en cepas de

todo el mundo, además de ser específicos. Estos Primers fueron evaluados con muestras tomadas a campo, durante un foco de tripanosomiasis en el pantanal de Brasil en 1997. Los resultados de este estudio con el *T. vivax* nos demuestran, que de los 45 animales muestreados 8 fueron positivos a microscopia, mientras que el método PCR, detecto un 71% de los animales (Ventura y col. 2001).

4.7.- INMUNIDAD

La característica principal de la infección con tripanosomas salivares es la capacidad de estos organismos para evadir la respuesta inmune del hospedador mediante la producción de formas recurrentes con características antigénicas distintas. Este fenómeno, reconocido por Ross y Thompson en 1910, se manifiesta en oleadas sucesivas de parasitemia con intervalos de pocos días, cada una de las cuales representa la multiplicación de una población de un nuevo tipo antigénico. Su fase decreciente se corresponde con la destrucción de esta población por anticuerpos. Así, la persistencia de una infección se debe a la evasión de la respuesta inmune por un cambio repetido en su carácter antigénico (Lumsden, 1972).

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, la cual produce una vez más un período de parasitemia elevado. 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.

Los antígenos variantes que se producen en las 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 un cultivo de tejidos también muestran variaciones antigénicas espontáneas, lo cual demuestra que la variación no es necesariamente inducida por el anticuerpo.

Puede demostrarse con microscopia 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 las proteínas de la cubierta, y que la variación antigénica se produce como resultado de un rearrreglo y selección de genes, producido al azar (Tizard, 1995).

Existen indicios de que animales que viven en una determinada región geográfica desenvuelven inmunidad para los VATs circulantes en la región. La entrada de animales reservorios venidos de otras regiones puede introducir tripanosomas portadores de VATs diferentes de los existentes en la región y con esto provocan nuevos brotes de tripanosomiasis. En el presente la epidemiología de la infección con ***T. vivax*** es poco conocida. Así la habilidad para diferenciar entre stocks morfológicamente similares el cual exhibe cualidades de interés epidemiológico, como la capacidad de infección de distintos hospederos, distribución geográfica y patogenicidad, sobre las bases de los repertorios de VATs podría ser de considerable importancia en

estudios epidemiológicos. Adicionalmente, como la respuesta inmune protectora del hospedero es VAT específico, un estudio del número y distribución de VAT serodemas en la naturaleza podría revelar información sobre el papel de la inmunidad contra los VATs en el control de la enfermedad (Jones y McKinnell, 1984).

Han sido propuestas dos hipótesis principales para explicar el fenómeno de la variación antigénica. Vickerman, 1978, considera que un cambio a un nuevo serotipo, efectuado por organismos que poseen un potencial genotípico de producir un rango de antígenos variantes, es una explicación más adecuada que la mutación genética. Otra hipótesis es propuesta por Newton y col, 1973, quienes suponen que la síntesis de los antígenos de los tripanosomas puede ser análoga a la de las inmunoglobulinas, en las que una región "variable" estaría expuesta al entorno, y la región "constante" o "común" localizaría al antígeno en la configuración correcta en la célula. La predicción de la aparición de variantes antigénicas es tema de debate. Gray, 1965. Señala que las variantes aparecen en una secuencia predecible y, además, tienden a revestir a un antígeno básico constante en transmisión cíclica. Sin embargo, Seed y Gam 1966, y McNeillage y col. 1969, demostraron que las variantes no surgen en una secuencia completamente ordenada, aunque algunas variantes se presentan con mayor frecuencia que otras. Los antígenos variantes están asociados con inmunidad protectora, pero solo contra el tipo antigénico homólogo. Dicha inmunidad puede ser estimulada por homogeneizados de tripanosomas, infección con tripanosomas irradiados, infección con tripanosomas muertos y quimioterapia (Dávila, 1995).

Pero desafortunadamente de todos los métodos citados solo la quimioprofilaxis es eficiente, debido a la diversidad de variaciones

antigénicas de los tripanosomas. Estudios demuestran que se puede hacer antígenos sobre la primera variante antigénica, pero como ya vimos pasados algunos días, estos tripanosomas tienen la capacidad de desarrollar una segunda variante antigénica y así sucesivamente, haciendo que los niveles de parasitemia oscilen en altos y bajos. Cuando están en niveles bajos de parasitemia, no se puede detectarlos con exámenes parasitológicos y serológicos, siendo aparentemente de fundamental importancia el método de diagnóstico PCR, para así obtener datos más precisos de los tripanosomas optimizando los estudios epidemiológicos, para el control de la enfermedad en nuestro medio.

4.8.- MEDIDAS DE CONTROL DE LA TRIPANOSOMIASIS

Por el momento no se dispone de vacunas o algún otro medio inmunógeno 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; Tizard, 1995).

La lucha contra la tripanosomiasis es difícil pues no solo los animales enfermos sino también los aparentemente sanos, son portadores de parásitos habiendo la posibilidad de un recrudecimiento de la sintomatología de la enfermedad en los animales, que posiblemente van acompañados de una elevación de los niveles de parasitemia suficientes para infectar los vectores hematófagos, siendo los tábanos los más importante, diseminando la infección entre los animales del área (Cuellar, 1998).

Los métodos de control a emplearse estarían destinados al tratamiento de los huéspedes infectados, y el ataque a los vectores. Es necesario destacar que ante la ausencia de la mosca tse-tsé en el continente Americano, las medidas para evitar la diseminación del ***T. vivax*** y ***T. evansi***, se enfocan solo a las moscas picadoras que transmiten el hemoparásito en forma mecánica y a los animales que padecen la infección y pueden transmitirla a los animales sanos en sus zonas de origen o distantes cuando se movilizan o son transportados por el hombre (Aguilar, 1996).

Se puede considerar que los métodos principales para evitar la diseminación de la parasitosis en la región pueden ser los que a continuación se indican:

- Diagnóstico clínico y de laboratorio precisos.
- Una vez comprobada la existencia del tripanosoma, es de vital importancia tratar a todos los animales, enfermos, sospechosos y en riesgo de contaminación.
- Antes de movilizar animales de áreas sospechosas de estar infestados, se recomienda la aplicación de fármacos quimioterápicos con un periodo residual prolongado (Isometamidium, Homidium).
- Identificación en cada uno de los países de los vectores que intervienen para producir la enfermedad y establecer programas eficientes para su control, sin que estos pudieran resultar dañinos al medio ambiente.
- Antes de hacer la movilización de animales debe efectuar un exterminio de los insectos hematófagos en los vehículos transportadores de ganado.
- Para controlar los insectos vectores lo más indicado es el uso de insecticidas como las deltametrinas, en su presentación "Pour-On".

- La vigilancia epidemiológica constante de los focos endémicos, promocionando el uso de inmunoestimulantes en los animales susceptibles.
- Ante la ocurrencia de una epidemia, medicar a los animales afectados y en riesgo con fármacos de eficiencia comprobada, notificando a los países vecinos del suceso, con el fin de que efectúen las medidas de cuarentena y preventivas que tengan establecidas (Rhone Merieux, 1995 y Wells, 1992).

4.9.- TRATAMIENTO

La actual, quimioterapia para la tripanosomiasis en los animales domésticos depende de seis compuestos, algunos de los cuales son químicamente relacionados. El **Dimenazene**, **Homidium** y el **isometamidium** son usados para el tratamiento y profilaxis de la tripanosomiasis en bovinos, ovinos y caprinos. La **Quinapiramina**, **Suramin** y la **melarsomina** son usados como agentes terapéuticos para infecciones con ***T. evansi***, sin embargo la Quinapiramina también puede ser usada para tratamientos profilácticos. Siendo estos tres últimos compuestos restringidos a equinos, camellos y búfalos. En 1997 la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA) y el programa de modernización técnica agropecuaria de la región central de Brasil (PROMOAGRO) conjuntamente realizó una estimación económica sobre control de la tripanosomiasis bovina y equina, empleando Isometamidium, que de acuerdo a las observaciones obtenidas, parece ser el medicamento de elección para las áreas infestadas del Pantanal, 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 ***T. vivax*** en regiones con alto y

mediano riesgo de infestación. Siendo así, se debe proceder con el tratamiento profiláctico estratégico donde se presenten prevalecias mayores o igual á 20%. Donde el tratamiento consistirá en tres aplicaciones del tripanocida. La primera aplicación en el inicio de las lluvias, la segunda en el medio y la tercera en el final de las lluvias. Obteniendo así una gran protección contra la enfermedad en el periodo de gran concentración de los tábanos, disminuyendo el riesgo de proliferación de la tripanosomiasis entre los animales (Aguilar, 1996).

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

Se observa entonces que es mucho más rentable hacer el tratamiento quimioprofiláctico en áreas de alto y mediano riesgo de la enfermedad. Siendo así, indicada en los siguientes casos: Cuando se sospecha o se comprueba un caso de tripanosomiasis en un grupo de animales; épocas de abundancias de tábanos; también cuando los animales son sometidos a algún tipo de estrés, contribuyendo al aparecimiento de elevada parasitemia en los animales portadores del parásito; cuando se introduce animales en una propiedad procedente de zonas con prevalencias de la tripanosomiasis.

La quimioprofilaxis disminuye el riesgo de recaída de los animales convalecientes y disminuye en alto grado la diseminación del parásito en los tábanos y animales. El medicamento de elección, es el Isometamidium, en

función de su prolongado periodo de protección conferido a los animales, siendo utilizado tanto para el tratamiento como para la profilaxis.

V.- MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- MATERIAL

5.1.1.- LOCALIZACIÓN DEL ÁREA

El perfil de la Provincia Ángel Sandoval fue creada por ley del 16 de diciembre de 1948 durante la presidencia del Dr. Enrique Hertzog. Se ubica en la región sudoeste del departamento de Santa Cruz tiene una extensión de 37.442 Km² de superficie territorial y su población se estima en 10.000 habitantes con una población ganadera estimada en 243.967 cabezas. Esta ubicada entre los 16° 22' al sur y 58° 23' oeste, sus límites son los siguientes: Al norte y al este con la Republica del Brasil. Al sur con las provincias Germán Busch y Chiquitos. Al oeste con las provincias de Velasco y Chiquitos.

La precipitación pluvial es de un promedio de 1.061 mm, la humedad relativa promedio es de 75%. El clima es el que corresponde al bosque húmedo tropical, la temperatura ambiente fluctúa entre los 22 °C y 35 °C. (CORDECRUZ, 1983, Montes de Oca, 1997,).

5.1.2.-MATERIAL DEL MUESTREO

- Tubos Vacutainer
- Aguja Vacutainer
- Lamina de Vidrio
- Papel Filtro
- Micro centrífuga

- Tubitos Capilares
- Microscopio
- Adaptador
- Plastilina

5.1.3.-MATERIAL PARA EL PCR

- Primers
- Centrifuga
- Termociclador
- Tubo de eppendorf
- Agua destilada
- Pipetas
- Redtaq Super Pack DNA Polimerase, SIGMA
- 10mM dNTP Mix (SIGMA)
- Gel Agarosa 1.5%
- Loading Buffer (SIGMA)
- Buffer TBE 10x (SIGMA)
- Submarino y cubeta para electroforesis horizontal de Geles
- Transluminador de luz ultravioleta
- Cámara fotográfica para PCR
- Cabina de flujo laminar

5.1.4.-TOMA DE MUESTRAS

Se tomaron 181 muestras del pantanal de la región de San Matías. Las propiedades fueron seleccionadas al azar. Finalmente los bovinos

muestreados fueron escogidos al azar o de acuerdo a la disponibilidad de animales en cada propiedad muestreada. El tamaño de muestra fue estimada considerando una prevalencia mediante PCR de 5,6 (Braga 2002), y una prevalencia mínima considerada de 1,3 (Aguilar 1998), con un nivel de error de 5% para una población de 243,967 de bovinos, dando un tamaño mínimo de 150 cabezas de ganado más el 10% de error de muestreo.

Los tipos de muestras tomadas fueron: sangre completa, tomada directamente de la oreja para la preparación de frotis y para los tubitos capilares para llevar a cabo la prueba de centrifugación de microhematocrito, para el diagnóstico de tripanosomiasis *in situ*, y sangre completa con anticoagulante de la vena coccígea en tubos vacutainer, para la preparación de las gotas de sangre en papel filtro y para luego hacer el diagnóstico mediante el método de PCR.

5.2.-MÉTODOS

5.2.1.- MÉTODOS DE LABORATORIO

5.2.1.1.-MÉTODO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

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

5.2.1.2.-MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DE PCR.

a) EXTRACCIÓN DE ADN DEL PAPEL FILTRO

La extracción de ADN para el posterior proceso de amplificación mediante PCR se realizó basada en el método descrito por Boid y col. (1999).

Procedimientos:

- Se colocó las muestras del papel filtro de 6 mm de diámetro en los tubos eppendorf y se adiciona 200 micro litros de agua destilada.
- Se incubaron los tubos en termociclador a 37 °C, durante 30 minutos.
- Luego se llevó a la centrífuga durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante.
- Se centrifugó durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante, y se lo transfirió a otros tubos.
- Se colocó a los tubos nuevamente 100 micro litros de agua destilada y se llevó al termociclador a 99.9 °C, durante 30 minutos.
- Se centrifugó durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante, y se lo transfirió a otros tubos eppendorf.

b) AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para la amplificación del ADN específico de *T. vivax* y/o *T. evansi* se utilizó los siguientes Primers.

Primers específicos para *T. vivax*. - producto amplificado de 400 pb (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

Primers específicos para *T. vivax*. – producto amplificado de 175 pb (Masiga y col, 1996).

TVWA 5' GTG CTC CAT GTG CCA CGT TG

TVWB 5' CAT ATG GTC TGG GAG CGG GT

Para *T. evansi* se utilizaran primers para *T. brucei*. – producto amplificado de 177 pb (Artama y Col, 1992)

TBR 1 5' CGA ATG AAT AAT AAA CAA TGC GCA GT

TBR 2 5' AGA ACC ATT TAT TAG CTT TGT TGC

Las condiciones de PCR fueron las condiciones utilizadas en el LIDIVET, la amplificación de PCR, fue realizada en una solución final de 25µl por muestra de las siguientes concentraciones:

- Para TWJ 1/2

Solución de PCR		Cantidad en microlitros (µl)
10x PCR Buffer	10µM Tris-HCl, pH 8,3, 50µM KCl, 1,5µM MgCl ₂	2,5
DNTP	200µM de cada deoxinucleótidos	0,5
TWJ 1	1µM	2,5
TWJ 2	1µM	2,5
Taq Polimerasa	1 unidad	1
Agua		8,5
DNA (muestra)		7,5
Total		25

- Para TVW A/B

Solución de PCR		Cantidad en microlitros (µl)
10x PCR Buffer	10µM Tris-HCl, pH 8,3, 50µM KCl, 1,5µM MgCl ₂	2,5
DNTP	200µM de cada deoxinucleótidos	0,5
TVW A	1µM	2,5
TVW B	1µM	2,5
Taq Polimerasa	1 unidad	1
Agua (PBS)		8,5
DNA (muestra)		7,5
Total		25

- Para TBR 1/2

Solución de PCR		Cantidad en microlitros (µl)
10x PCR Buffer	10µM Tris-HCl, pH 8,3, 50µM KCl, 1,5µM MgCl ₂	2,5
DNTP	200µM de cada deoxinucleótidos	0,5
TBR 1	0,4 µM	1
TBR 2	0,4 µM	1
Taq Polimerasa	1 unidad	1
Agua		11,5
DNA (muestra)		7,5
Total		25

La amplificación de ADN fue realizada usando un termociclador “Gene Amp PCR System 9700” (Applied Biosystems).

Todos los primers se corrieron en 30 ciclos en las siguientes condiciones:

Para el *T. vivax* (TWJ 1/2)

	Temperatura (°C)	Tiempo
Incubación inicial	94	3'
Desnaturalización	94	1'
Hibridación	55	2'
Extensión	72	2'
Incubación final	72	5'

Para el *T. vivax* (TVW A/B)

	Temperatura (°C)	Tiempo
Incubación inicial	94	3'
Desnaturalización	94	30'
Hibridación	60	1'
Extensión	72	30'
Incubación final	72	5'

Para el *T. evansi* (TBR 1/2)

	Temperatura (°C)	Tiempo
Incubación inicial	94	3'
Desnaturalización	94	45''
Unión de Primers	60	1'
Alargamientos	72	30''
Incubación final	72	5'

c) ELECTROFORESIS

Todas las muestras después de ser amplificadas se corrieron en un gel agarosa al 1,5% con Tris – Borate – EDTA. Concluida la electroforesis los productos de PCR fueron observados en un transiluminador de luz ultravioleta.

5.2.2.-MÉTODO ESTADÍSTICO

El análisis de datos se realizó basado en los resultados obtenidos mediante los métodos parasitológicos y de PCR. La comparación de métodos de diagnóstico se realizó basado en el análisis de Kappa usando el programa de computadora Epi Info 6. El cálculo de prevalecias y la comparación de proporciones se llevó a cabo mediante Chi cuadrado y/o prueba exacta de Fisher usando el programa de computadora Epi Info 6.

VI.- RESULTADOS

6.1. Diagnostico de la Tripanosomiasis Mediante los Métodos Parasitológicos y PCR.

En el presente trabajo de investigación se identificó animales positivos a la tripanosomiasis tanto en los métodos parasitológicos como en el método de PCR (cuadro 1, grafico 4). Mediante los métodos parasitológicos, del total de 181 animales, se identifico 9,39% de animales infectados con *T. vivax*, no se identificaron animales positivos a *T. Evansi*. Cuando las muestras fueron procesadas mediante el método de PCR utilizando los primers TWJ 1/2 para *T. vivax* resultaron 11,6% muestras positivas (grafico 1) y con el primer TVW A/B para *T. vivax* resultaran 15,47% muestras positivas (grafico 2) y con el primer TBR 1/2 para *T. evansi* resultaron 1,11% muestras positivas (grafico 3).

CUADRO N° 1

POSITIVOS Y NEGATIVOS A TRIPANOSOMIASIS BOVINA EN LAS DIFERENTES PRUEBAS

Pruebas	Positivos	Porcentaje	Negativos	Total
Parasitológica Tv ^a	17	9,39	164	181
Parasitológica Te ^b	0	0,00	181	181
PCR TWJ ^c	21	11,6	160	181
PCR TVW ^d	28	15,47	153	181
PCR TBR ^e	2	1,1	179	181

a = Método parasitológico para *Trypanosoma vivax*

b = Método parasitológico para *Trypanosoma evansi*

c = Método de reacción en cadena de la polimerasa para *Trypanosoma vivax*.

d = Método de reacción en cadena de la polimerasa para *Trypanosoma vivax*.

e = Método de reacción en cadena de la polimerasa para *Trypanosoma evansi*.

6.2. Concordancia y No Concordancia entre los Métodos Parasitológicos y PCR

Se obtuvo resultados positivos a *tripanosoma vivax*, tanto por los métodos parasitológicos y PCR. Empleando 2 primers distintos para la amplificación del DNA de *tripanosoma vivax* se observó que los resultados obtenidos por PCR empleando ambos primers tenía una concordancia significativa con los resultados obtenidos mediante parasitología. Así también se observó una concordancia significativa cuando se comparo los resultados de ambos primers entre sí (cuadro nº 2).

Se debe hacer notar que a pesar de emplear 2 primers que tenía como blanco secuencias distintas del DNA del parásito aún se observó la presencia de muestras positivas a parasitología que no fueron identificadas con ninguno de los primers mencionados (cuadro nº 2).

CUADRO N° 2

CONCORDANCIA ENTRE LOS MÉTODOS

PARASITOLÓGICOS Y PCR

PCR TWJ T. Vivax		Parasitológico <i>T. vivax</i>		
		Positivo	Negativo	Valores Kappa
	Positivo	13	8	0,648
	Negativo	4	156	

(P<0,001)

PCR TVW T. Vivax		Parasitológico <i>T. vivax</i>		
		Positivo	Negativo	Valores Kappa
	Positivo	16	12	0,673
	Negativo	1	152	

(P<0,001)

PCR TVW T. Vivax		PCR TWJ <i>T. Vivax</i>		
		Positivo	Negativo	Valores Kappa
	Positivo	20	8	0,788
	Negativo	1	152	

(P<0,001)

❖ No se hizo la comparación con los resultados de ***T. evansi***, debido a que no se demostró ninguno positivo a parasitología.

o Los parámetros para la evaluación de los resultados obtenidos por el análisis de Kappa son: > 0,81: concordancia casi perfecta; 0,61 – 0,80: concordancia muy buena; 0,21 – 0,40: concordancia regular; 0 – 20: baja concordancia y los negativos no hay concordancia (Thrusfield, 1995).

6.3. Prevalencia de la Tripanosomiasis Bovina en el Pantanal de San Matías

El presente estudio determino la presencia de la tripanosomiasis bovina en el pantanal de San Matías, siendo las especies de tripanosomas detectados el *T. vivax* y el *T. Evansi*, mediante las pruebas parasitológicas y de PCR.

Se evaluó las muestras para *T. vivax* de forma paralela sometiéndose cada muestra a un examen parasitológico y mediante PCR empleando 2 primers distintos para *T. Vivax*; considerándose un animal infectado, o positivo, cuando la muestra daba positivo a cualquier de las pruebas a las que fueron sometidas, la prevalencia estimada mediante esta aproximación epidemiológica para *T. vivax* fue de 18,23% (IC 12,89 – 24,64) (gráfico 5).

Para *T. evansi* solo se evaluaron las muestras mediante métodos parasitológicos y PCR empleando un solo primer. Estimándose una prevalencia para este parásito de 1,11% (IC 0,13 – 3,9) (grafico nº 5).

6.4. Factores de Riesgo de la Tripanosomiasis Bovina

Haciendo un análisis buscando identificar factores de riesgo para la tripanosomiasis, se analizaron los factores raza, sexo y edad. El grafico nº 6 muestra la proporción de animales positivos detectados por raza, donde se observó un mayor número de positivos en los animales europeos, habiendo una diferencia significativa entre animales de razas europeas con las razas nelore y mestizo ($P < 0.05$). No se encontró diferencia significativa entre las razas Nelore y Mestizo (grafico 7).

También se puede observar que un factor de riesgo significativo es la edad, como se demostró en el grafico nº 6, donde se puede observar que existen una mayor proporción de animales positivos en los animales mayores a 24 meses (grafico nº 8).

Cuando se evaluó sexo como factor de riesgo no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras (grafico nº 6).

VII.- DISCUSIONES

Mediante resultados obtenidos en el presente estudio se pudo observar y confirmar que el diagnóstico de la tripanosomiasis empleando el método de PCR, es más eficiente debido a la mayor sensibilidad en el método de PCR, comparando con los métodos parasitológicos. El método de PCR logró detectar muestras positivas a *T. evansi*, lo que no se pudo observar en las pruebas parasitológicas, debido a que los bovinos son portadores crónicos del *T. evansi*, con niveles de parasitemia bajos. Los métodos parasitológicos no detecta hasta uno 50% de los animales positivos (Nantulya, 1990). Mediante el método de PCR se pudo detectar bovinos positivos a *T. evansi* y también un mayor numero de positivos a *T. vivax* demostrando una mayor sensibilidad. Resultados similares ya fueron reportados en la provincia de Guarayos donde Braga (2002) reportó una mayor prevalencia para *T. vivax* mediante PCR (5,6%) que por parasitología (4,8%), del mismo modo solo identificó animales positivos a *T. evansi* mediante PCR, reportando una prevalencia de 2,4%.

El presente estudio confirma que la tripanosomiasis bovina, es endémica en el Pantanal de San Matías provincia Ángel Sandoval; se reportó una prevalencia de 18,23% siendo este un nivel preocupante, ya que la ganadería de San Matías se ve muy afectada por esta enfermedad. Se debe recalcar que la prevalencia estimada en este estudio es la mayor prevalencia a tripanosomiasis reportada hasta hoy en Bolivia. Otros estudios fueron llevados a cabo por Braga (2002) en la provincia Guarayos y Aguilar (1998) en San Ignacio de Velasco, los cuales reportaron prevalencias mucho menores a las reportadas es este estudio.

Las condiciones climatológicas y de manejo de la zona son condiciones ideales para la mantención y transmisión de la enfermedad.

Gran parte del año, el pantanal se encuentra inundado, dificultando todo tipo de manejo, pero el problema se acrecienta en la época de bajada de las aguas. En esta época hay un aumento en la abundancia de vectores acompañado de una elevación de la temperatura ambiente, hay pérdida de masa corporal debido a la baja oferta de alimentos resultando en un mayor número de animales debilitados, situación propicia para la proliferación de la tripanosomiasis.

T. vivax es una especie patógena que produce una tasa considerable de mortalidad. El ganado bovino que sobrevive, desarrolla un estado crónico de la enfermedad presentándose como portadores, permitiendo la difusión de nuevos casos por la abundante existencia de los insectos transmisores (tábanos y otras moscas picadoras) (Hall y col. 1993 y 2001) que están presentes en el medio. Los pequeños y grandes ganaderos de San Matías reportan que en los meses de septiembre, octubre y noviembre, hay un incremento en la población de vectores, acompañado de un mayor número de animales enfermos, estos datos se tomaron realizando una encuesta al momento de tomar las muestras (datos no presentados en el presente trabajo).

Se observó que el sexo no es un factor de riesgo para la adquisición de la enfermedad, no existió diferencia significativa entre machos y hembras; este resultado confirma los hallazgos reportados al respecto por Braga (2002) y Rodrigues (2003). Por el contrario la edad y la raza de los animales demostraron una diferencia significativa, en la adquisición de la tripanosomiasis. Braga (2002) no identificó a la raza como un factor de

riesgo, pero si Rodríguez (2003) encontró diferencias significativas en cuanto a raza. En cuanto a edad tanto Braga (2002), Rodríguez (2003) y el presente estudio concuerdan en identificar a esta variable como un factor de riesgo importante para la adquisición de la enfermedad.

Es probable que en los animales viejos ocurra una deficiencia inmunitaria debilitada, lo que posibilita una mayor difusión del parásito en la sangre, o también se puede deber a la mayor frecuencia en lo que los tábanos pican a los animales viejos, debido a su pasividad y poca reacción por las picaduras de estos insectos, lo cual ya fue reportado por Hall y col. (2001).

En la raza de los animales se observó una diferencia significativa entre animales de raza nelore y mestizo con las razas europeas. En los animales de raza europea se observó una notoria infección, decaimiento, debilidad y enflaquecimiento. En busca del mejoramiento genético y ganancia de peso rápida muchos ganaderos en la región del Pantanal de San Matías optaron por toros de razas europeas, pudimos observar, durante el muestreo que estas propiedades tenían una baja tasa de natalidad, por que la mayoría de los toros encontrados presentaban la enfermedad. Estos toros no estaban en condiciones de monta y por tanto se puede notar el efecto de esta enfermedad en altas pérdidas económicas por bajos índices reproductivos.

Para la pecuaria bovina en Bolivia este estudio demostró la importancia económica de esta enfermedad, causada por la mortalidad de los animales, disminución de los índices reproductivos, disminución en la producción de leche, terneros nacidos muertos o debilitados y los gastos en medicamentos. Las manifestaciones clínicas no se identifican de manera precisa o adecuada con el actual sistema de notificación. Necesitan más estudios y drogas eficientes para el combate de la tripanosomiasis bovina, estas informaciones

abren un espacio de interrogantes sobre la epidemiología y las repercusiones financieras que tiene la tripanosomiasis bovina en el área del Pantanal de San Matías.

VIII.- CONCLUSIONES

El presente estudio determinó la presencia endémica de la tripanosomiasis bovina en el Pantanal de San Matías, con una prevalencia de 18,23% para *T. vivax* (Grafico nº 5) y 1,11% para *T. evansi* (Grafico nº 5).

La identificando de la presencia de los parásito o la presencia de ADN del *T. vivax* y *T. evansi*, los cuales son indicativos de infección activa nos demostró un cuadro preocupante de la infección en el Pantanal de San Matías, siendo una región endémica que ofrece un constante riesgo para la población bovina existente en esta región.

La situación es clara y nos llama a un desafío de seguir investigando más sobre esta enfermedad, ya que el vector existe y el parásito también creemos que con un manejo adecuado y la aplicación de tratamientos estratégicos con tripanosomiasis, se contribuirá a controlar la enfermedad y reducir las pérdidas que hasta el momento viene causando a la ganadería de San Matías.

IX.-BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, M. S S. R. 1996. Trypanosomose Bovina por *Trypanosoma vivax* en Bolivia; Propostas para o Controle y Estudos Epizootiológicos. Corumbá, Brasil, Embrapa Informe Técnico. pp. 1-24.
- AGUILAR, M. S. S. R. 1996. *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*: Biología, Epizootiología y Métodos Diagnósticos. Corumbá – Brasil. pp. 1 – 80.
- AGUILAR, S.L.A. 1997. 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 Zootecnia, 4 -78.
- ARTAMA, W.T., AGEY, M.W. Y DONELSON, J.E. 1992. ADN Comparison of *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitology*. pp. 67 – 104.
- BARBET, A. F. Y MCGUIRE, T.C. 1978. Crossreacting determinants in variant specific surface antigens of African Trypanosomas. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*,75: 1989 - 1993.
- BARBET, A. F. Y MCGUIRE, T. C. 1982. Purification of *Trypanosoma brucei* variable surface glycoproteins. Analysis of degradation occurring during isolation. *Parasitology*, 85: 511 - 522.
- BARBET, A. F., MUSOKE, A. J., SHAPIRO, S. Z., MPINBAZA, G. Y MCGUIRE, T. C. 1981. Identification of the fragment containing cross

reacting antigenic determinants in the variable surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 83: 623 - 637.

BALTZ, T., GIROUD, C., BALTZ, D., ROTH, C., RAIBAUD, A. Y EISEN, H. 1986. Stable expression of two variable surface glycoproteins by cloned *trypanosoma equiperdum*. *Nature london*, 319: 602 - 604.

BOERO, J.J. 1976. Parasitosis Animal. 4^a ed. Eudeba, Buenos Aires-Argentina, pp. 109.-129.

BORST, P., FASE FOWLER, F. Y GIBSON, W. C. 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol. Biochem. Parasitology*, pp. 23: 31 - 38.

BRAGA, F. F., 2002. Evaluación del Método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el Diagnóstico de la Tripanosomiasis Bovina, Municipio de Ascensión de Guarayos, Departamento de Santa Cruz. Tesis de Grado de la U.A.G.R.M. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pp. 5 - 40.

CORDERO, C. M., ROJO, V. F. A., MARTINEZ, F. A. R., SÁNCHEZ, A. M. C., HERNÁNDEZ, R. S., NAVARRETE, L. C. I., DIEZ, B. P., QUIROZ, R. H. Y CARVALHO, V.M. 1999. Parasitología Veterinaria. Ed. McGraw-Hill-Interamericana. Madrid, España. pp. 302-309.

CROSS, G. A. M. 1975. Identification, Purification and Properties of Clone Specific Glycoprotein Antigens Constituting the Surface Coat of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, pp. 71: 396 - 417.

- CUELLAR, A. M. Y CARRIQUE, J. J. 1998. Informe sobre investigación epidemiológica de tripanosomiasis en el área de San Matías y Pantanal Boliviano (Provincias Velasco y Ángel Sandoval). LIDIVET, Bolivia.
- 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* pp. 65: 139-148.
- 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* pp.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
- HALL, M., CHAINEY, J., BETELLA, P. Y ARAMAYO, J.L. 1993. Tabanidae of Santa Cruz, Bolivia, and Their Role as Pets 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. 1965. Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes. *Acta Tropica*. XXII, 3: pp 204 -213.

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

HUTYRA-MAREK-MANNINGER-MOCSY, 1973. Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos. Traducido de la 11ª Edición del Alemán por Clemente Sánchez. 3 ed Labor, Barcelona, España, pp. 361-393.

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

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* pp. 9: 53-62.

LUN, Z. R. Y DESSER, S, S. 1995. Is the Broad Range of Hosts and Geographical Distribution of *Trypanosoma evansi* Attributable to the loss of Maxicircles kinetoplast DNA?. *Parasitology Today*, pp. 11 (4): 131 - 133.

MANNINGER, R. Y JOHANNES, M. 1973. Patología y Terapéutica Especiales de los Animales Domésticos. Tomo I Enfermedades Infecciosas. Labor, Barcelona España. pp. 361 – 366.

MASAKE, R. A., NANTULYA, V. M., PELLE, R., MAKAU, J. M., GATUO, H. Y OLE-MOIYOI, O. K. 1994. A Species-specific Antigen of *trypanosoma*

(*Duttonella*) *vivax* Detectable the Course of Infection is Encoded by a Differentially – Expressed Tandemly – Reiterated Gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* pp. 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* pp. 85:193-205.

MERCK, C. y col. 2000. El Manual Merck de Veterinaria. 5ª ed. Océano. Barcelona, España, pp. 92-96.

MILLER, E. N. Y TURNER, M. J. 1980. Análisis of antigenic types appearing in first relapse populations of clones of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 82: 63-80.

MUÑOZ, K. and Chávez. (2001). *Tripanosoma evansi* isolates from capibara (*Hidrochaeris hidrocaeris*). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96 (7): pp. 945 - 946

QUIROZ, R.H. 1989. *Parasitologia y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos*. 3ª Ed. Limusa. México, pp. 70-87.

SEED, J. R., EDWARDS, R. Y SECHELSKI, J. 1984. The Ecology of Antigenic Variation. *J. Protozool*, **31**: 48-53.

- SEIDL, A., DAVILA, A. M. R. Y SILVA, R. A. M. S. 1999. Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, **94** (2): 269-272.
- 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* (Ziemann, 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 protozoarios; 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.
- STEVENS, J.R. and GIBSON, W. 1999. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitology Today*. 15 (11): pp. 432 – 436.
- RHONE MERIEUX. 1995. Trypanidum, un avance de la quimioprofilaxis. Rhone Merieux. Colombia, S.A. Santa Fé de Bogotá, 1-12.

- RODRIGUES, S. S., 2003. Estudios Seroepidemiológico de la Tripanosomiasis Bovina, Municipio de Ascensión de Guarayos, Departamento de Santa Cruz. Tesis de Grado de la U.A.G.R.M. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, pp. 5 - 52.
- TIZARD, I. 1995. Inmunología Veterinaria. 4 ed. Interamericana. México, pp. 344-352.
- TURNER, C. M. R., BARRY, J. D., MAUDLIN, I. Y VICKERMAN, K. 1988. An estimate of the size of metacyclic variable antigen repertoire of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Parasitology*, 97: 269-276.
- 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 – Epidemiologia y Repercusión, F.A.O. Julio – Septiembre, 17-23.

X.- ANEXOS

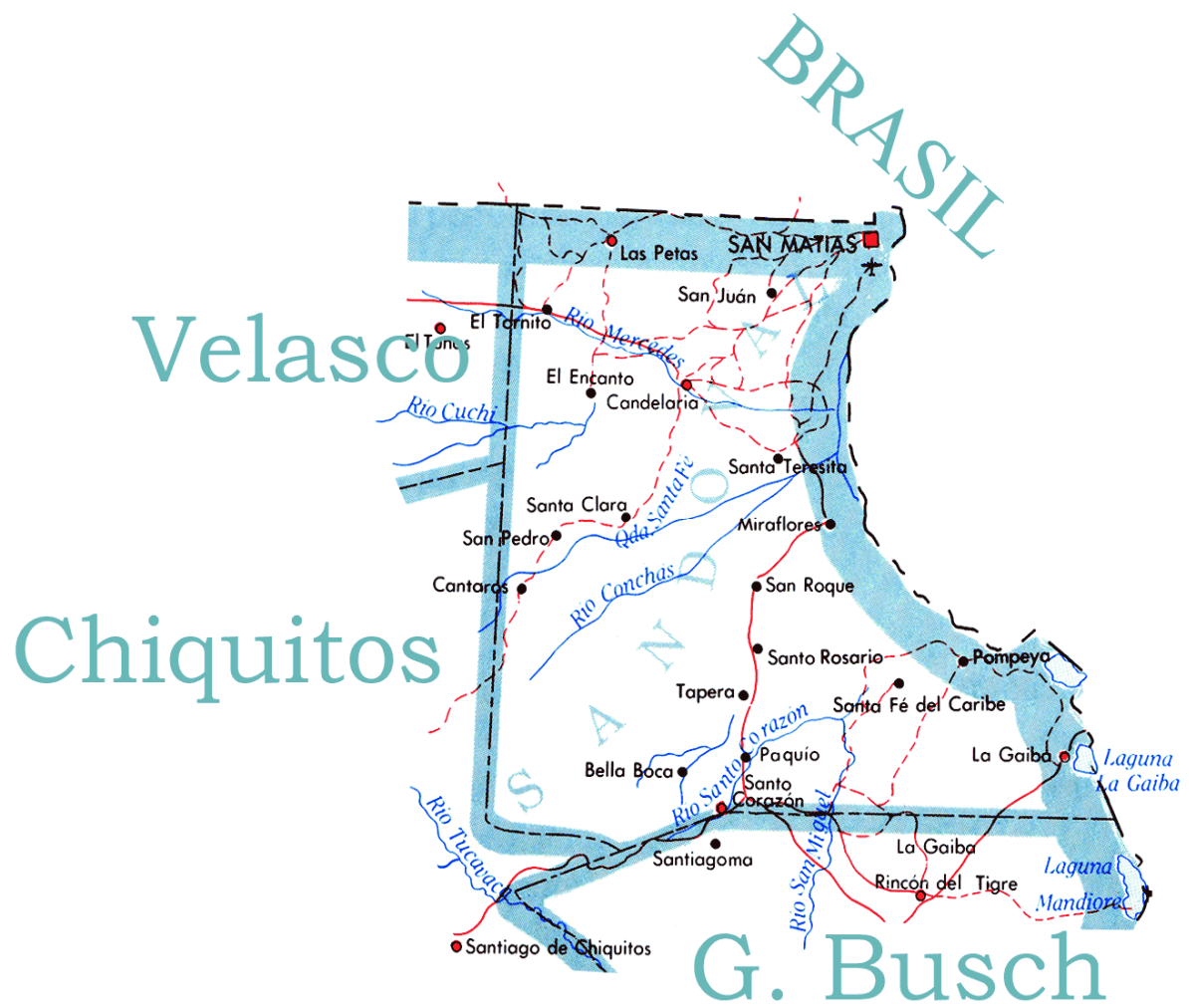
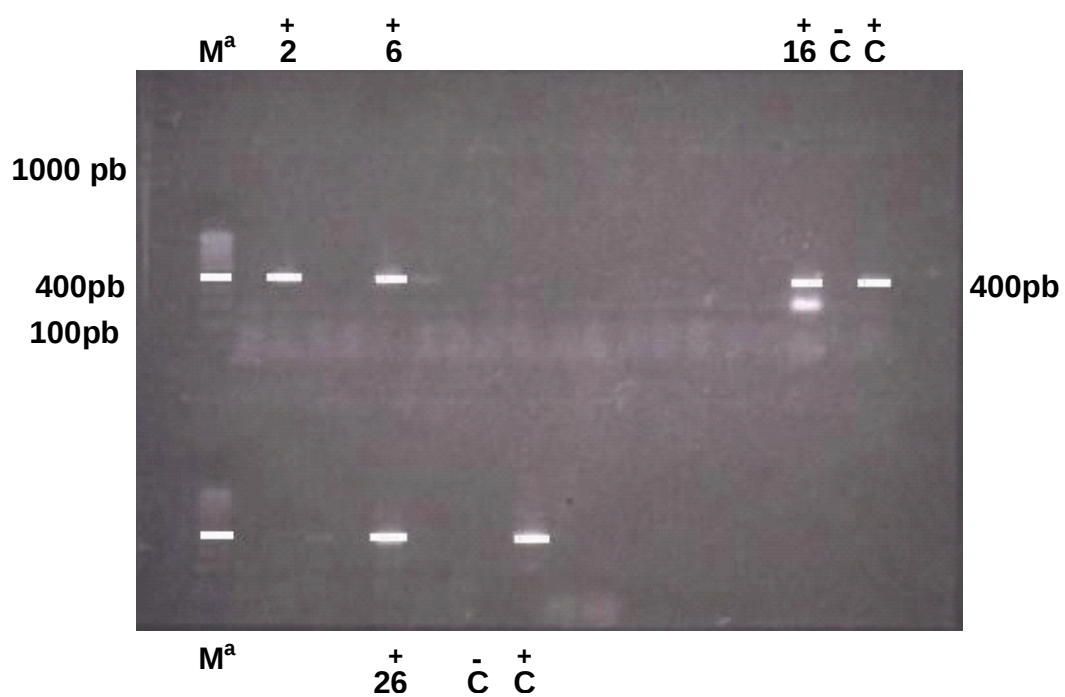


GRAFICO N° 1

Muestras Positivas a *T. vivax* Empleando los Primers TWJ 1/2 400 pb



M^a = Marcador molecular

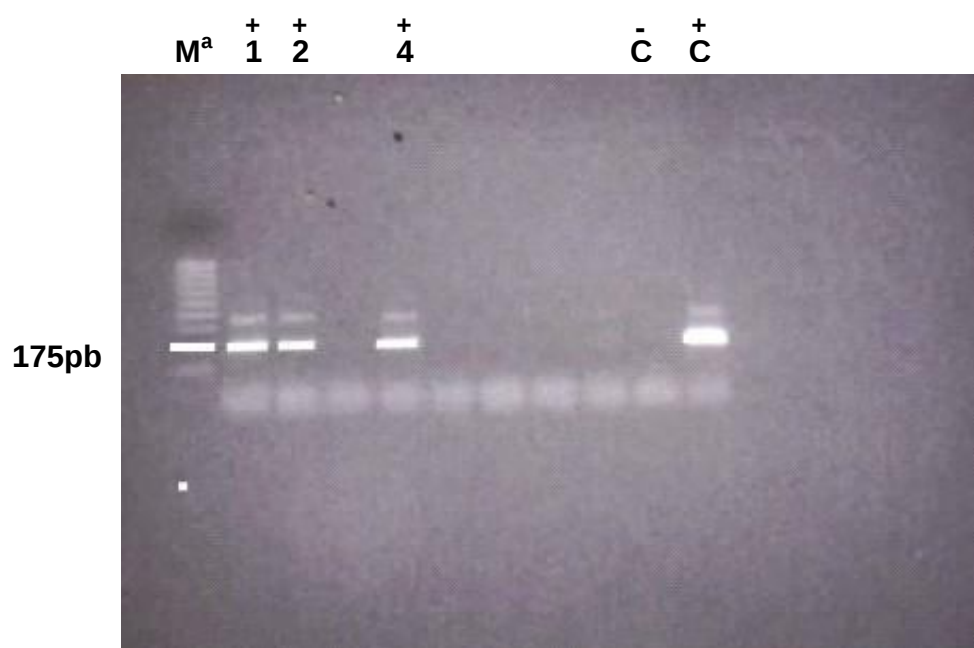
C^- = Control negativo

C^+ = Control positivo

2, 6, 16 y 26 + = Muestras positivas

GRAFICO N° 2

Muestras Positivas a *T. vivax* Empleando los Primers TVW A/B 175 pb



M^a = Marcador molecular

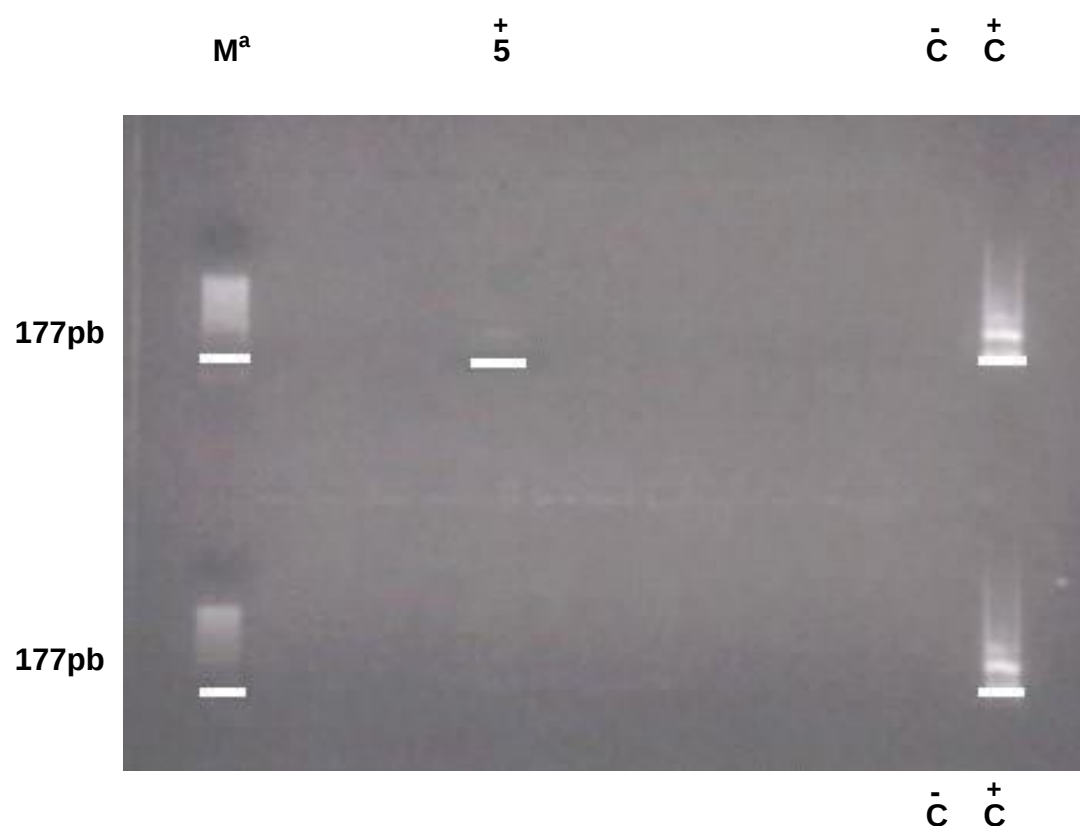
C⁻ = Control negativo

C⁺ = Control positivo

1, 2 y 4⁺ = Muestras positivas

GRAFICO N° 3

Muestras Positivas a *T. evansi* Empleando los Primers TBR 1/2 177 pb



M^a = Marcador molecular

C^- = Control negativo

C^+ = Control positivo

5^+ = Muestras positivas

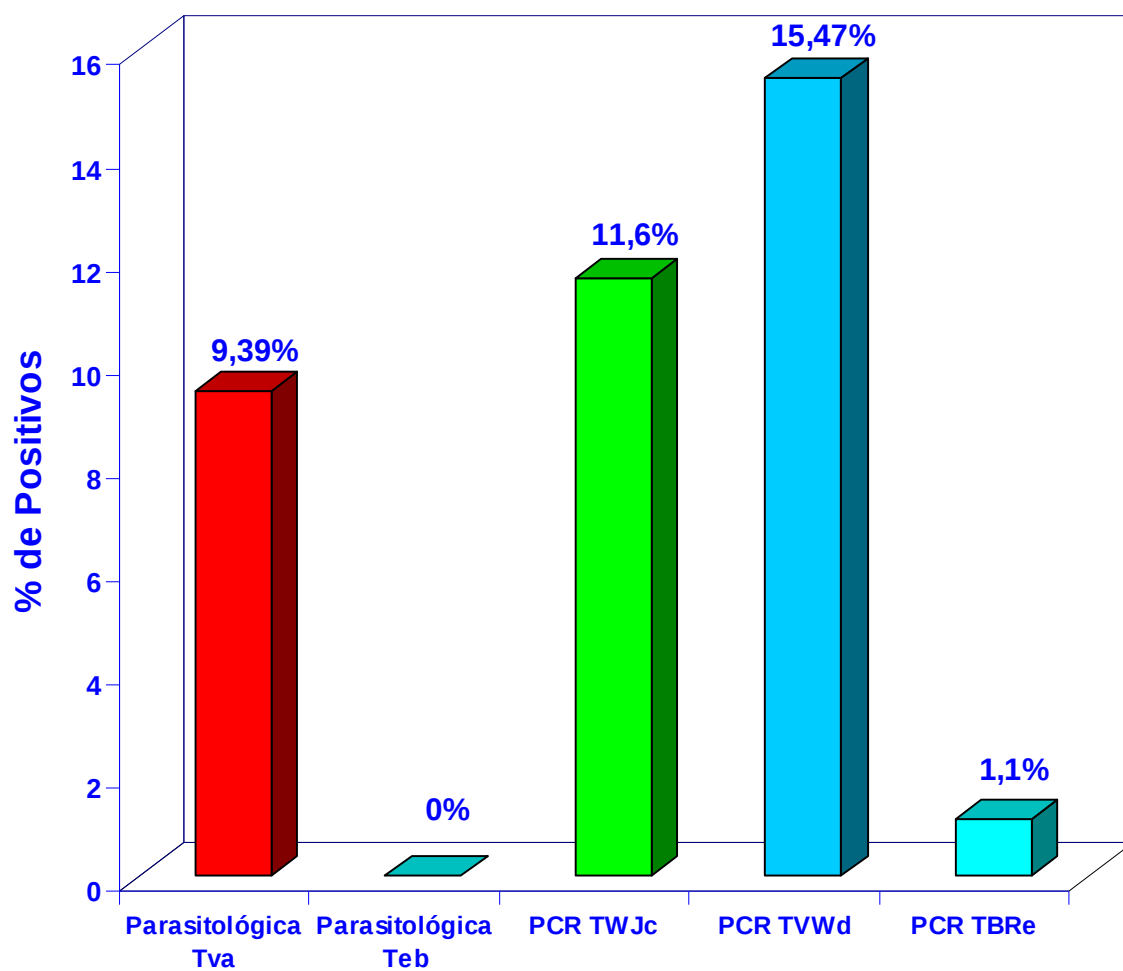
GRAFICO N° 4**PORCENTAJE DE ANIMALES POSITIVOS A
TRIPANOSOMIASIS BOVINA EN LAS DIFERENTES PRUEBAS**

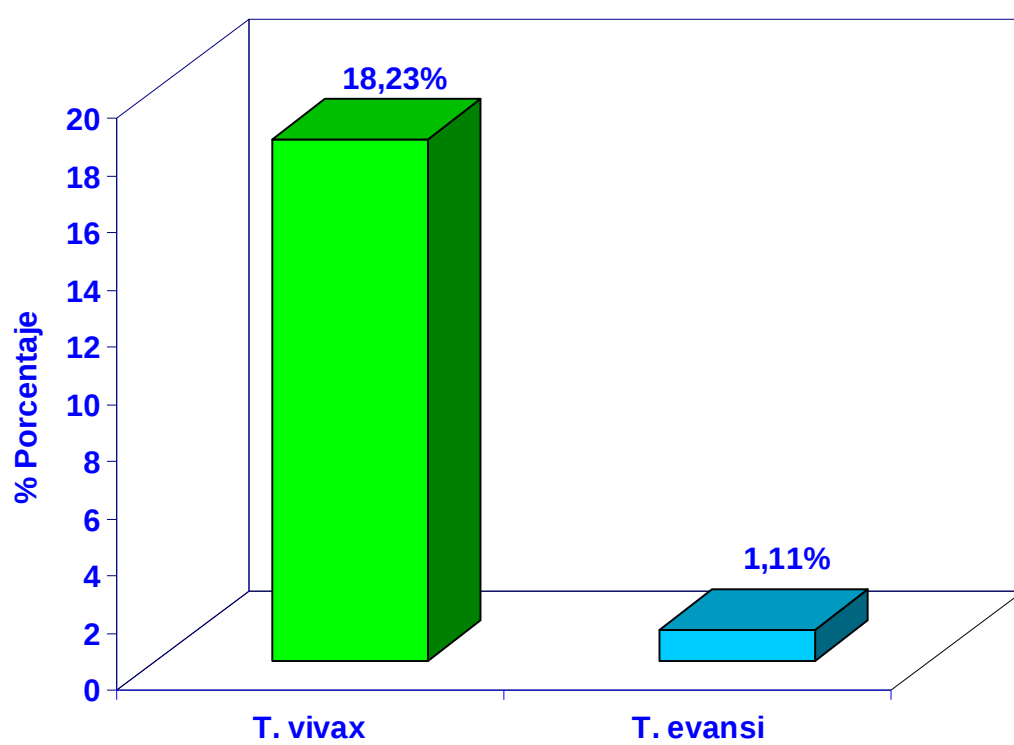
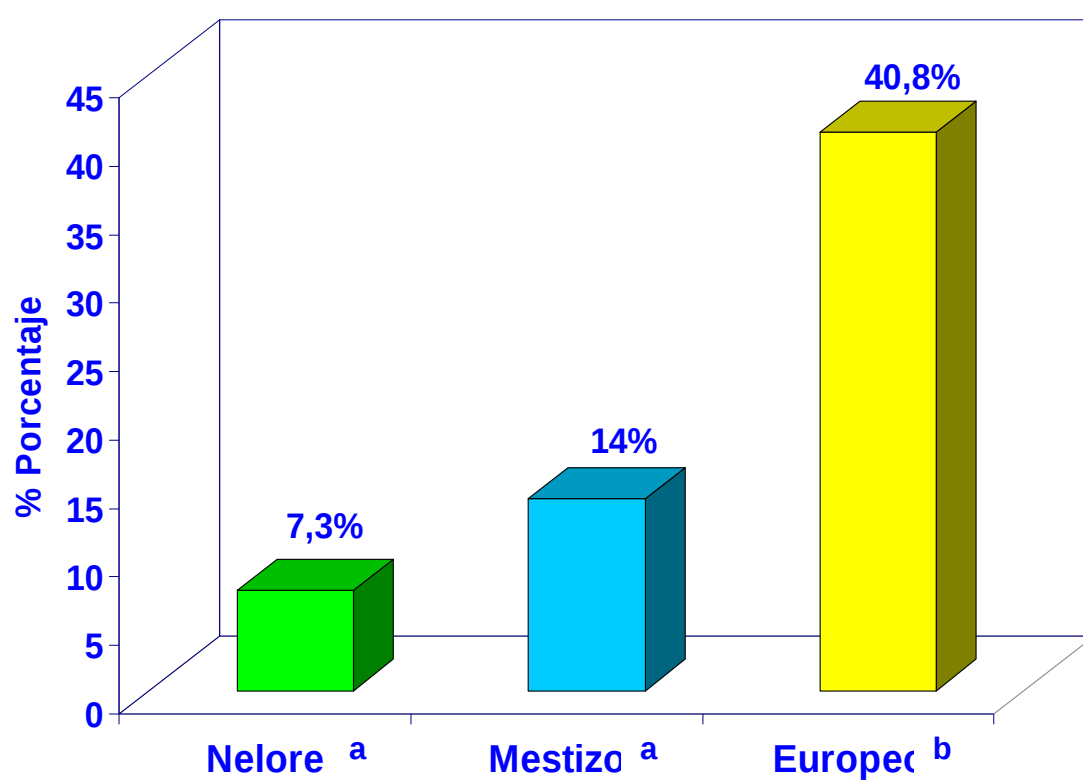
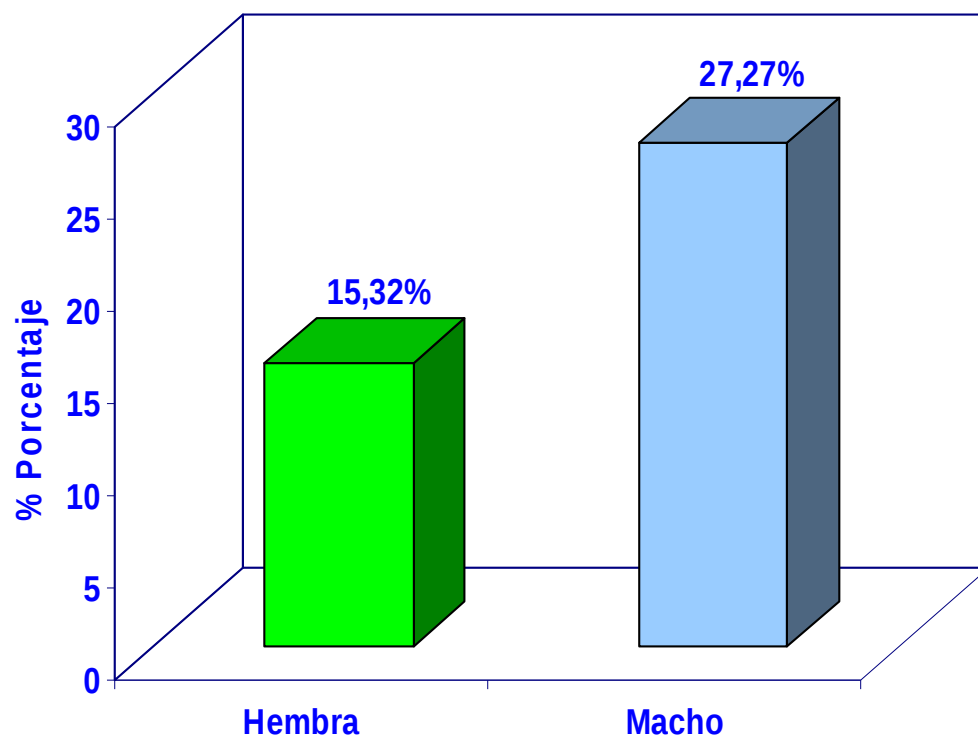
GRAFICO N° 5**PREVALENCIAS OBTENIDAS EN EL
PANTANAL DE SAN MATÍAS**

GRAFICO N° 6

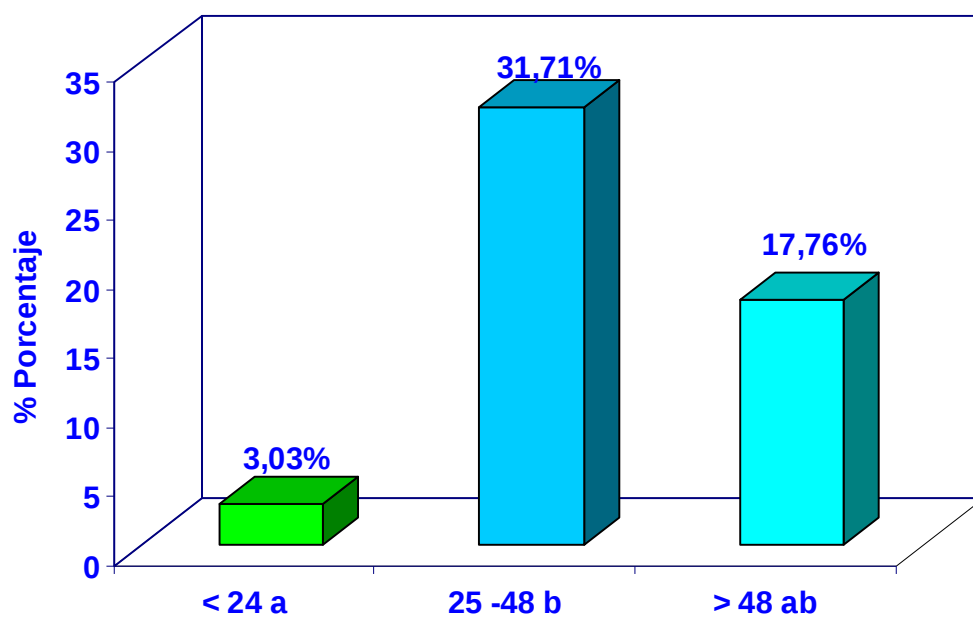
PROPORCIÓN DE ANIMALES POSITIVOS POR RAZA



Razas con distintos superíndices difieren de forma significativa ($P < 0,05$).

GRAFICO N° 7**PROPORCIÓN DE ANIMALES POSITVOS POR SEXO**

No se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$).

GRAFICO N° 8**PROPORCION DE ANIMALES POSITIVOS POR EDAD**

Hay una diferencia significativa entre animales mayores de 24 meses y menores de 24 meses ($P < 0,05$).