



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



# UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

### “Evaluación del uso de un medicamento para el tratamiento y el control de la tripanosomiasis bovina”

Autor: Viscarra Sánchez, Lissette Melissa

Director: Reyna Bello Armando PhD.

Marzo del 2022

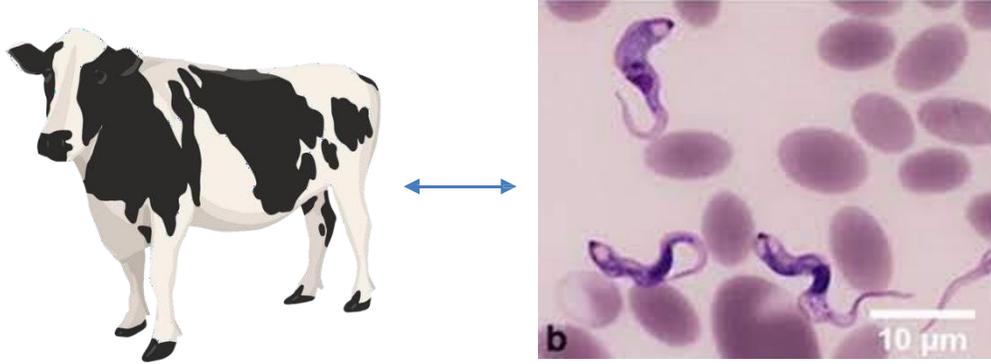


# Lista de contenidos

- Introducción
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones



## Tripanosomosis Bovina



## Taxonomía de *T. vivax*

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	Trypanosoma
Subgénero	Duttonella
Especie	<i>T. vivax</i>

## Distribución geográfica e impacto económico



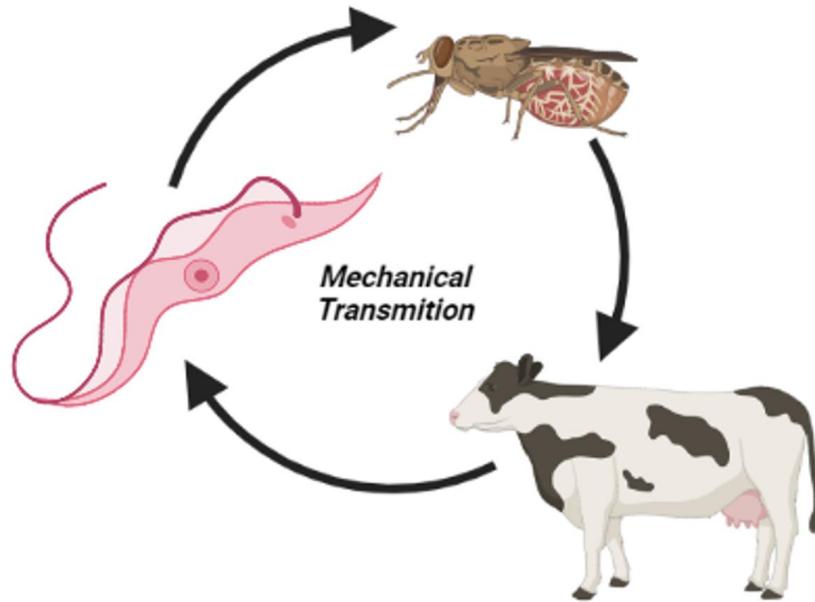
África: 5 billones de dólares al año y 30 millones en medicinas.

En regiones como Brasil y Bolivia se han estimado pérdidas potenciales de USD 160 millones.

(Desquesnes et al., 2022)



## Transmisión

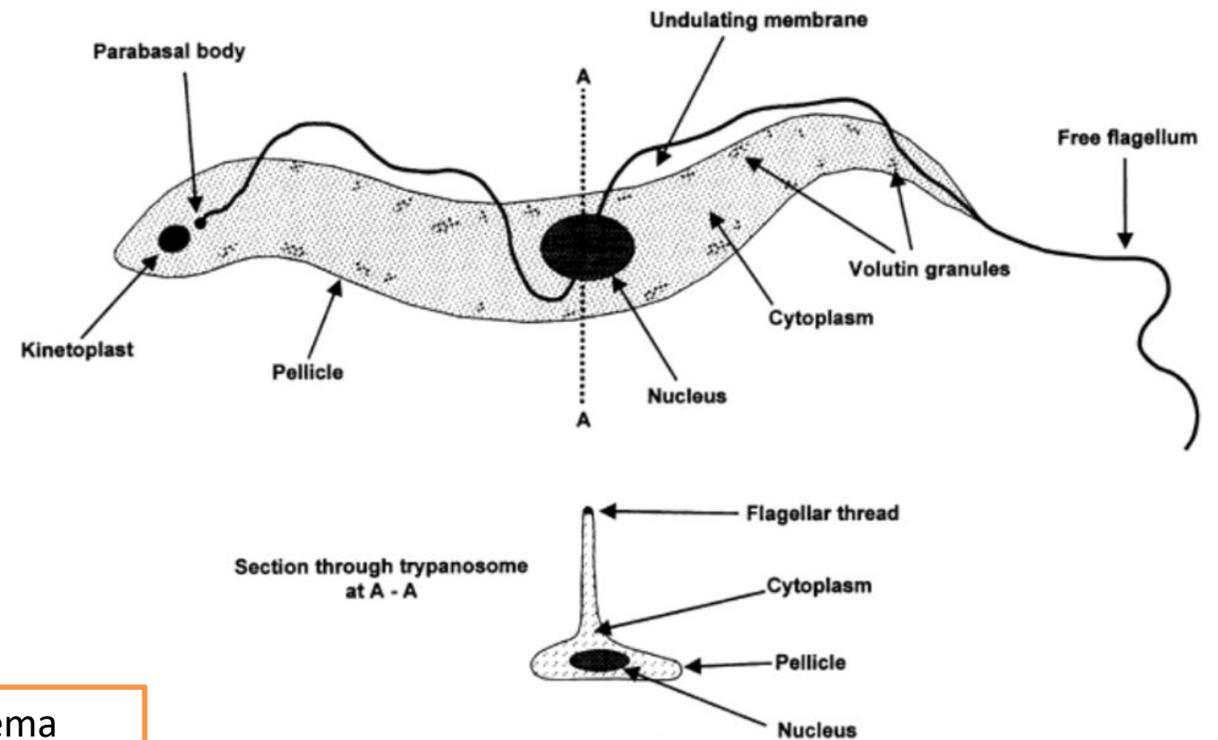


## Signos clínicos

- Anemia
- Fiebre
- Ictericia
- Bajo HTC
- Caída de la producción
- Alteraciones en el sistema reproductivo
- Pérdida en la condición del animal
- Incluso la muerte

(Gonzatti, et al., 2014).

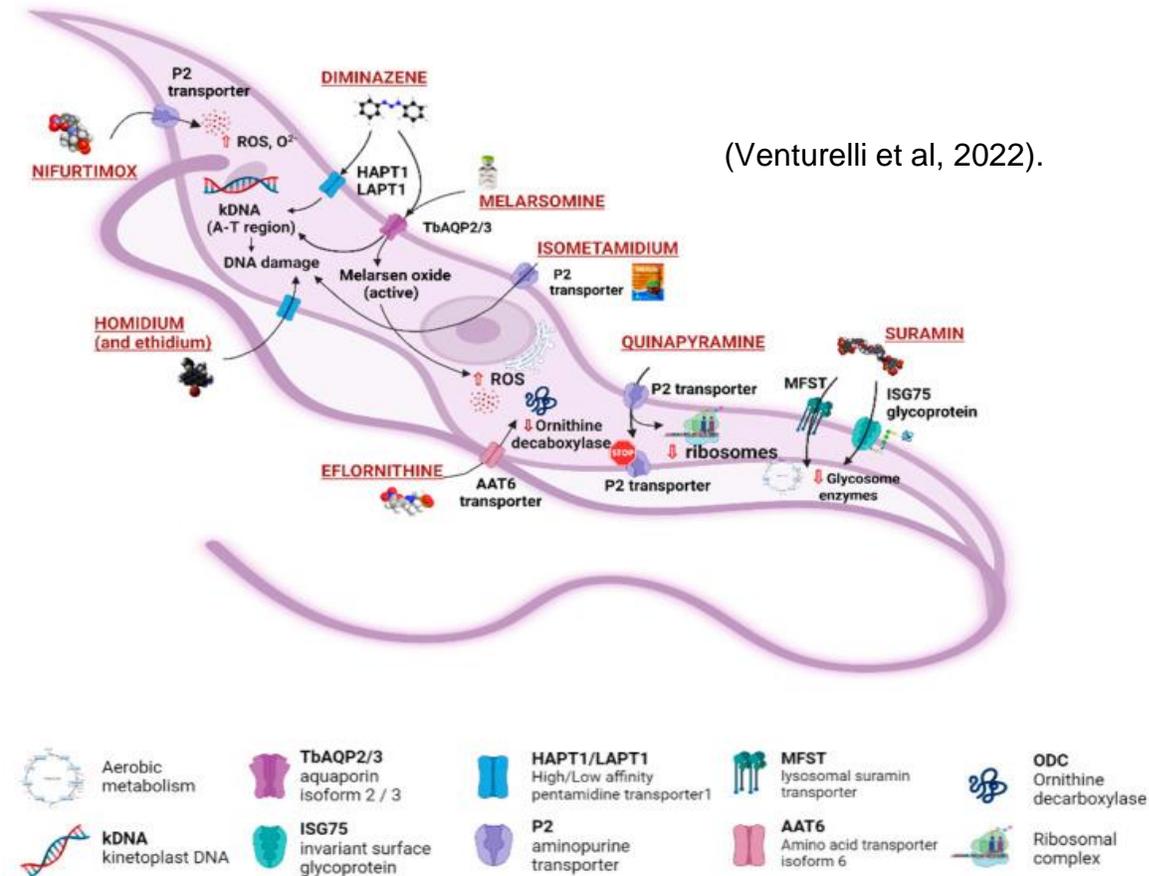
## Estructura subcelular de *Trypanosoma vivax*



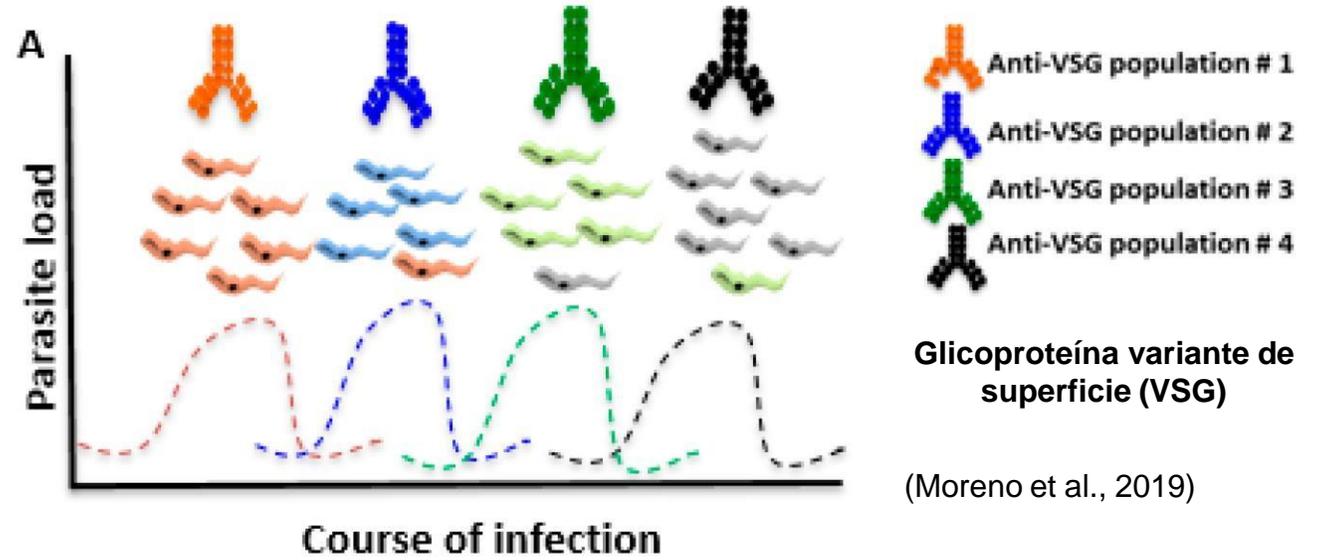
(Dagnachew, S. & Tessema, M., 2015).

## Tratamiento

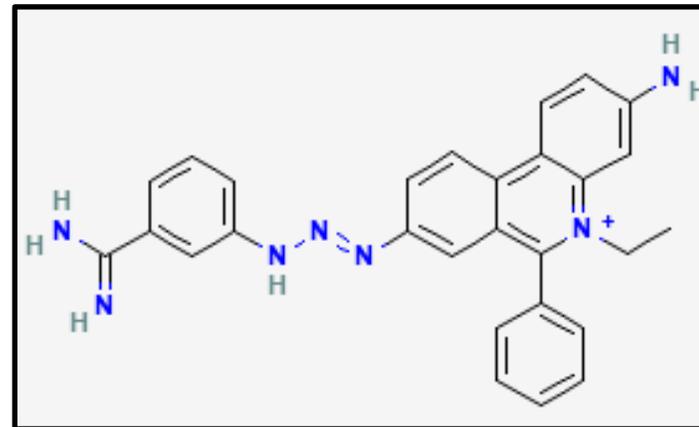
(Venturelli et al, 2022).



## Aspectos inmunológicos



## Cloruro de isometamidium



(NCBI, 2023)



## ***Objetivo general***

Evaluar del uso de un medicamento para el tratamiento y el control de la tripanosomosis bovina.

## ***Objetivos específicos***

- Estandarizar la prueba de PCR para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina
- Determinar la prevalencia de *T. vivax* mediante PCR en zonas con previos reportes de la enfermedad
- Evaluar la eficacia del tratamiento a base cloruro de isometamidium para el control de la tripanosomosis bovina



## Hipótesis

El cloruro de isometamidium puede eliminar completamente al *Trypanosoma vivax* de la circulación sanguínea de bovinos infectados.



## Muestreos en la provincia de Orellana

### 1° muestreo

Confirmación de casos positivos por pruebas parasitológicas

### 2° muestreo

Toma de muestras y aplicación del medicamento

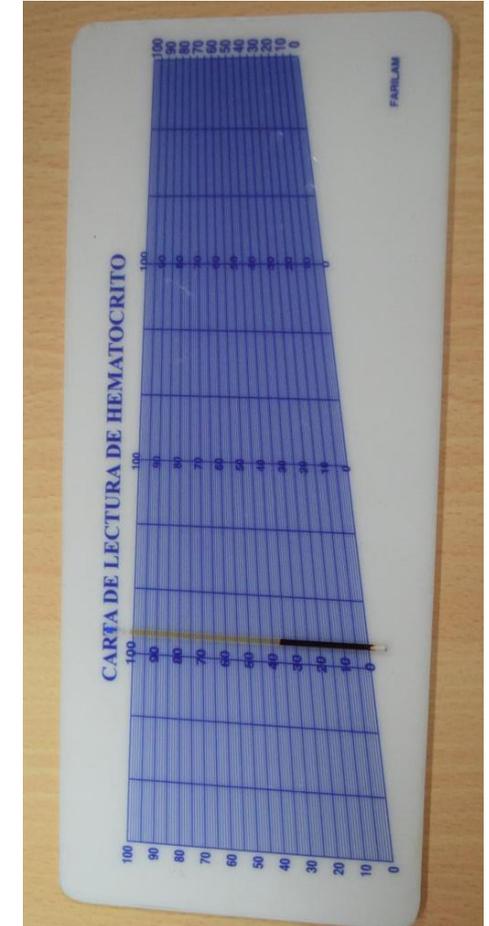
### 3° muestreo

Toma de muestras a aquellos animales que se les aplicó el tratamiento

## Toma de muestras



## Lectura del HTC



## Extracción de ADN

Cell Harvest

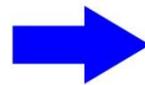
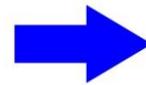
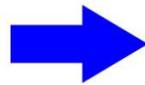
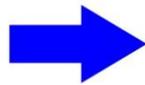
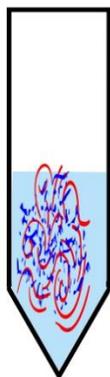
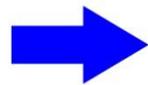
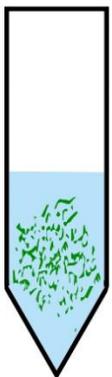
Cell Lysis

Protein Removal

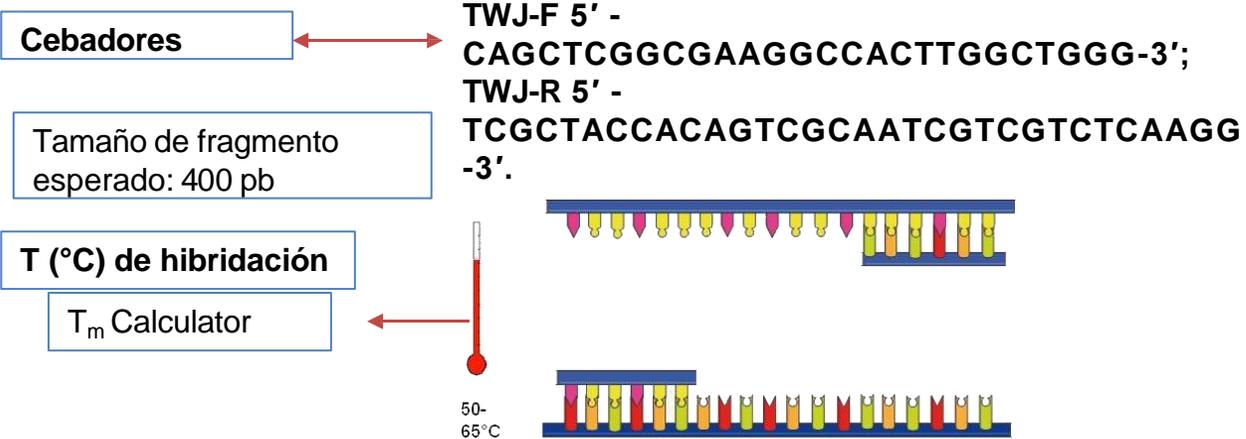
DNA Binding

Wash

DNA Elution



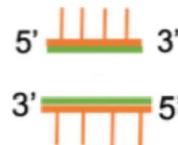
## Estandarización de la TWJ-PCR



### Variables analizadas

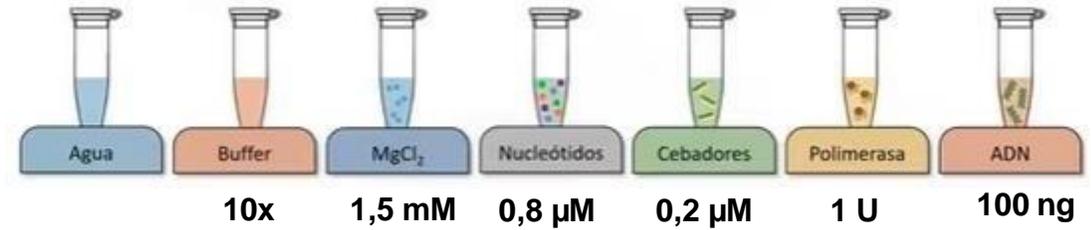


Temperatura de hibridación (58-68 °C)



Concentración de cebadores (0,2-0,5 µM)

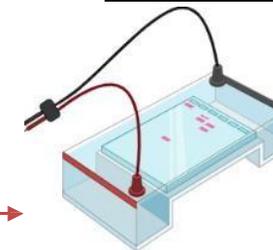
### Concentraciones iniciales de reactivos



### Condiciones de la reacción térmica

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	54-62	1	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	1	1
Mantenimiento	4	∞	-

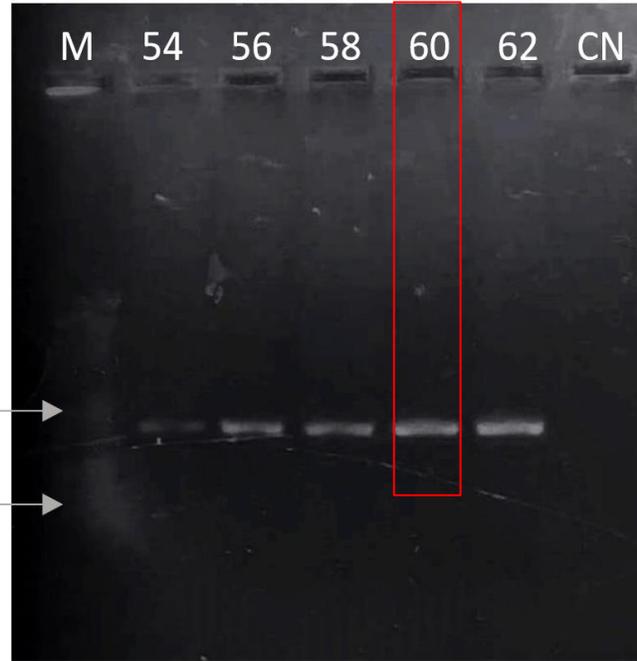
### Termociclador



Gel de agarosa al 1,5%,  
45 min - 100 V

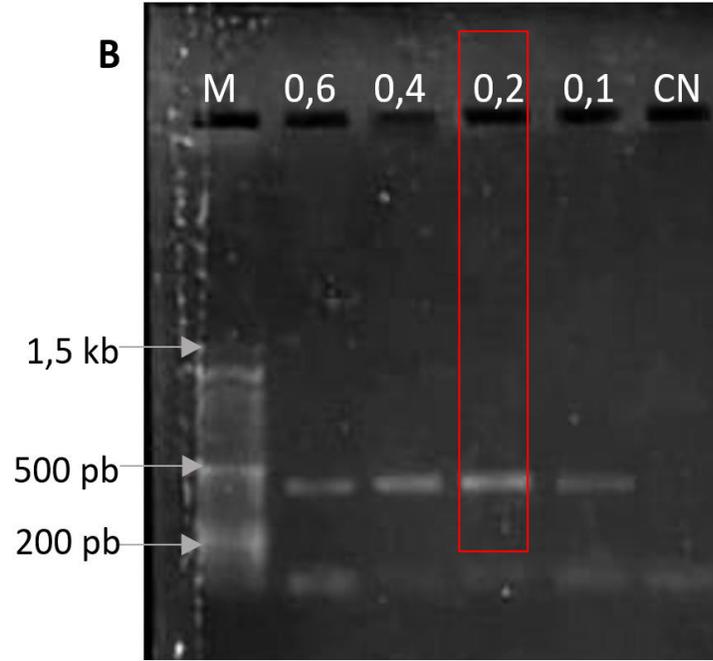


**A**  
Gradiente de temperatura



La temperatura de 60 °C presentó mayor intensidad

**B**



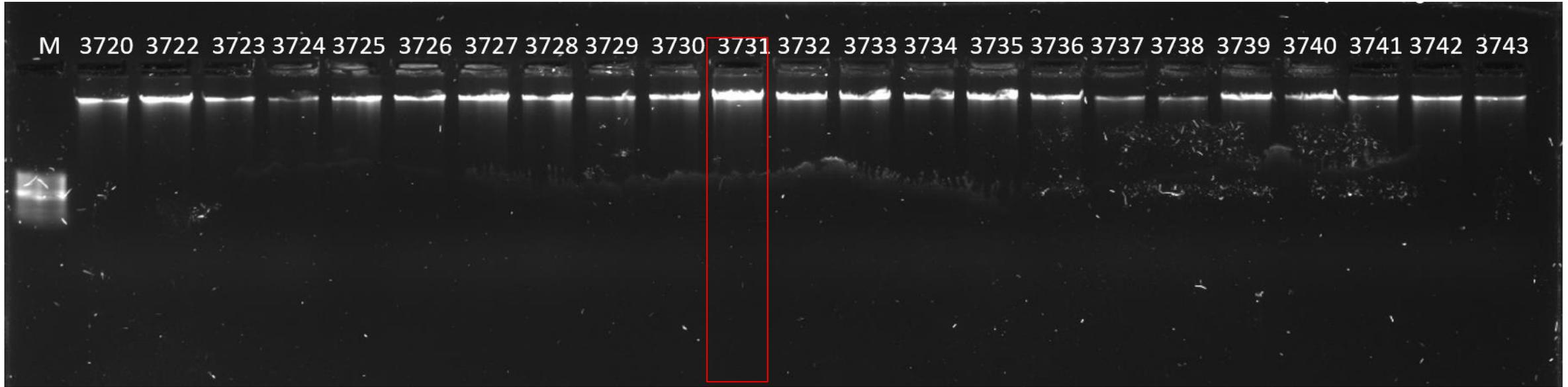
Gradiente de cebadores

Se seleccionó la concentración de 0,2 μM

Condiciones de la reacción

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	35
Hibridación	60	1	35
Extensión	72	1	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	





Protocolo modificado Riera, et al., 2010

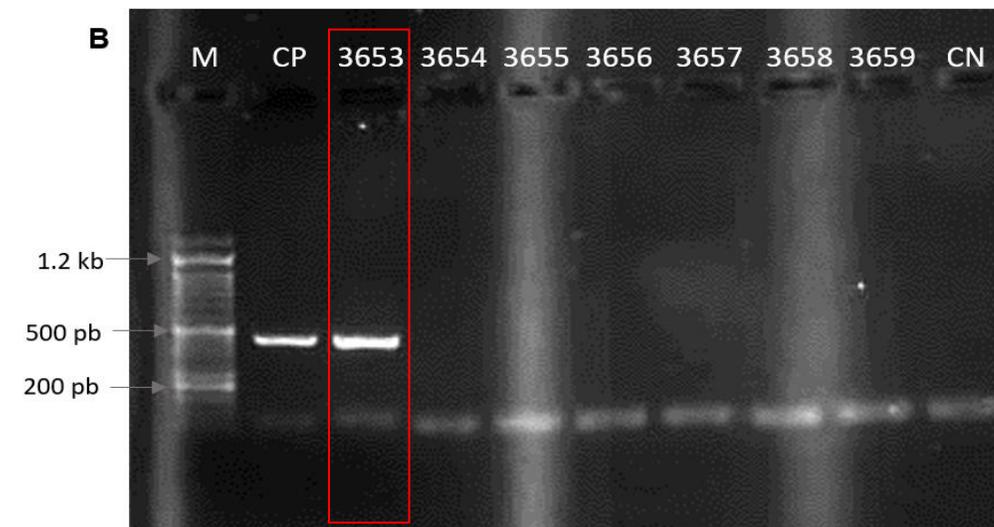
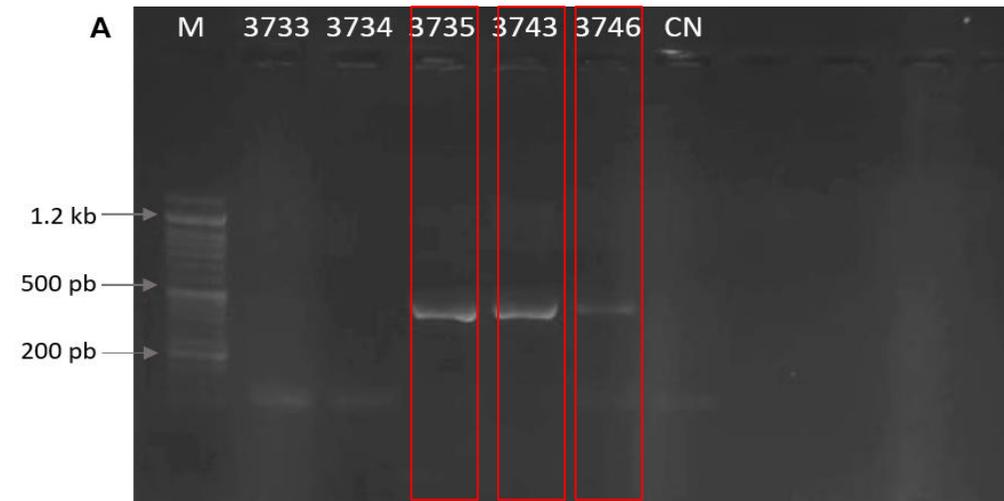


## Prueba parasitológica de Woo

Código único.	Temperatura	Hematocrito	Woo
Sabo-3298	38,9	32	Positivo
Sabo-3339	37,9	32	Positivo
Sabo-3409	39,5	32	Positivo
Sabo-3414	39,4	35	Positivo
Sabo-3427	39,1	26	Positivo
Sabo-3433	41,1	14	Positivo
Sabo-3443	37,3	18	Positivo
Sabo-3444	37,6	21	Positivo
Sabo-3456	39,6	29	Positivo
Sabo-3465	38,5	31	Positivo
Sabo-3467	38,6	33	Positivo
Sabo-3474	38,4	36	Positivo
Sabo-3475	38,8	41	Positivo

Código único.	Temperatura	Hematocrito	Woo
Sabo-3653	37,9	16	Positivo
Sabo-3680	39,3	32	Positivo

## Prueba PCR

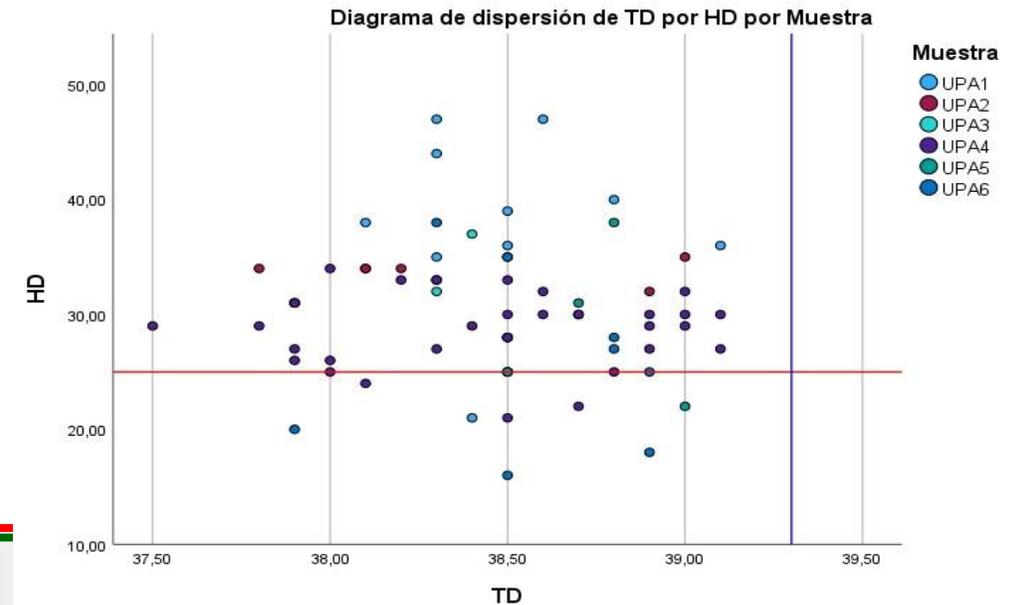
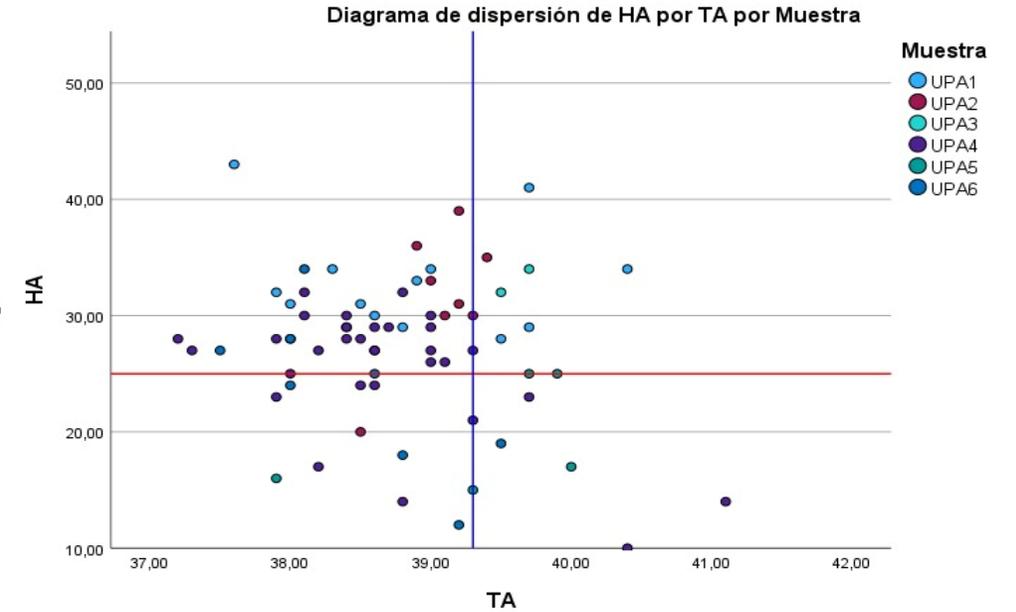


## Post Tratamiento



## Análisis estadístico

Por medio de la prueba de T Student se determinó que la temperatura es una variable que asocia con una infección por *T. vivax*, al obtener una significancia menor que 0.05, rechazando la  $H_0$ .





- El tratamiento de ISM mostró eficacia para eliminar *T. vivax* del torrente circulatorio y eliminó nuevas incidencias del parásito en las zonas aplicadas.

Prueba	Positivos
Microcentrifugación del HTC – Woo	15
TWJ-PCR	4



Kit comercial de Thermo Scientific presentó menos degradación y mayor intensidad en el ADN extraído.

La temperatura de hibridación de 60 °C y 0,2 μM de concentración de los primers, son los valores más favorables para la TWJ-PCR.

- ❖ Se recomienda realizar este estudio en una población con una mayor prevalencia de *T. vivax*, para contrastar la eficiencia del tratamiento frente al hemoparásito.
- ❖ Se recomienda el uso del tratamiento a base de cloruro de isometamidium para el tratamiento de la tripanosomosis bovina ocasionada por *T. vivax*.
- ❖ Se recomienda la extracción de ADN mediante el kit comercial.
- ❖ Se recomienda añadir pasos de lavado y desalinización al protocolo casero..
- ❖ Para cuantificar con exactitud la cantidad y la pureza del material genético se recomienda el uso de métodos específicos como espectrofotometría o fluorometría.





Dr. Armando Reyna Ph.D.  
Ing. Fausto Bedoya  
Ing. Sebastián Osorio  
Ing. Cristina Cholota  
Laboratorio de Biología Molecular  
Laboratorio de Biotecnología Animal - Matriz



## *Familia y amigos*

El trabajo de titulación fue realizado dentro del marco de actividades del proyecto “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)”, financiado por la Academia de Investigación y Enseñanza Superior - ARES de Bélgica.

