



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

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS – ESPE**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORA: RODRÍGUEZ CABEZAS ANDREA LOURDES**

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE CLONACIÓN Y  
SECUENCIACIÓN DE REGIONES ITS DE DIFERENTES AISLADOS DE  
*Trypanosoma sp.* EN ECUADOR”**

**DIRECTORA: CHÁVEZ MARÍA AUGUSTA M.Sc.**

**SANGOLQUÍ, FEBRERO**

**2017**



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación "Caracterización molecular mediante clonación y secuenciación de regiones ITS de diferentes aislados de *Trypanosoma sp.* en Ecuador", realizado por, **Andrea Lourdes Rodríguez Cabezas** ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **Andrea Lourdes Rodríguez Cabezas** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 7 de Junio del 2017

**Dr. María Augusta Chávez M.Sc.**

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Yo, Andrea Lourdes Rodríguez Cabezas, con ID 1.00284339 y cédula de identidad N 1716074560 declaro que este trabajo de titulación "*Caracterización molecular mediante clonación y secuenciación de regiones ITS de diferentes aislados de Trypanosoma sp. en Ecuador*" ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada

Andrea Lourdes Rodríguez Cabezas

1716074560

Sangolquí, 19 de Junio del 2017



### AUTORIZACIÓN

Yo, **RODRIGUEZ CABEZAS ANDREA LOURDES**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE REGIONES ITS DE DIFERENTES AISLADOS DE *Trypanosoma sp.* EN ECUADOR”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 14 de Julio del 2017



Andrea Lourdes Rodríguez Cabezas

1716074560

## DEDICATORIA

Dedico el presente proyecto con mucho amor a Dios quien me dio salud, Fe y fortaleza para cumplir una meta en mi vida.

A mis padres, mis hermanos por su apoyo incondicional y su inmenso amor, ya que forman el pilar que me permitió culminar esta etapa de mi vida.

A mi abuelita Camilita quien me dejo sus enseñanzas y me motivó siempre a seguir adelante.

A mi esposo Andrés por su amor, comprensión y su apoyo siempre.

A mí adorado hijo Andresito quien es mi motivación, inspiración y felicidad.

*Andrea Lourdes Rodríguez Cabezas*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida y ser mi fortaleza en cada momento.

Le agradezco a mi Padre por ser una persona maravillosa, a quien admiro, gracias por los consejos, valores, y su amor lo que me han motivado a seguir adelante.

A mi Madre por su ayuda incondicional, comprensión, amor, por ser mi mejor amiga ya que con cada palabra de aliento me impulso a seguir adelante. Siendo mis padres mi ejemplo de vida a seguir.

A mi esposo por su amor y apoyo en cada momento. Te amo mucho.

A mi hijo Andresito porque ha sido mi más grande bendición y cada sonrisa brindada ha sido el impulso que me motiva a seguir y no rendirme.

A la Dra. María Augusta Chávez, por el apoyo y confianza brindada durante este proyecto.

Al Dr. Jorge Ron Román, por su colaboración y sus aportes científicos.

Al Dr. Armando Reyna-Bello, por la confianza, asesoramiento científico y tiempo brindado durante el presente proyecto.

Al Dr. Ramiro González, por su cooperación para la adquisición de muestras en el Camal Metropolitano de Quito.

A los estudiantes de veterinaria Elvis Morales y Tomás Albán, por la ayuda prestada en la recopilación de muestras en el Camal Metropolitano de Quito.

A las tesisistas del laboratorio

A mis amigas por su amistad durante estos años.

*Andrea Lourdes Rodríguez Cabezas.*

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción.....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Objetivo general .....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5
CAPITULO 3 .....	6
3. REVISIÓN DE LITERATURA .....	6
3.1. Tripanosomosis.....	6
3.1.1. Generalidades.....	6
3.3. Morfología .....	8
3.3.1. <i>Trypanosoma evansi</i> .....	8
3.3.2. <i>Trypanosoma theileri</i> .....	9
3.4. Taxonomía .....	9
3.4.1. <i>Trypanosoma evansi</i> .....	9
3.4.2. <i>Trypanosoma theileri</i> .....	9
3.5. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma evansi, theileri</i> y <i>vivax</i> .....	10
3.6. Características moleculares .....	11
3.7. Epidemiología y filogenia de <i>Trypanosoma sp.</i> .....	13
3.8. Métodos de diagnóstico .....	16
3.8.1. Métodos directos.....	16
3.8.2. Métodos moleculares .....	17
3.9. Hipótesis.....	18
CAPITULO 4 .....	19
4. METODOLOGÍA .....	19
4.1. Instituciones participantes.....	19
4.4. Fase de laboratorio .....	20
4.4.1. Prueba de Woo.....	20
4.4.2. Extracción manual de ADN a partir de sangre total .....	20
4.4.3. Cuantificación de ADN .....	22
4.4.4. Identificación de muestras positivas a <i>Trypanosoma sp.</i> .....	22
4.4.4.1. Optimización de Nested PCR.....	23
4.4.5. Clonación.....	25
4.4.5.1. Ligación.....	26
4.4.5.2. Transformación.....	26
4.4.5.3. Selección.....	27
4.4.6. Extracción de ADN plasmídico.....	27

4.4.7. Amplificación de plásmidos a través de PCR .....	28
4.4.8. Secuenciación .....	29
CAPÍTULO 5 .....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. Optimización de la técnica nested PCR.....	30
5.2. Evaluación de la presencia de <i>Trypanosoma sp.</i> .....	31
5.3. Caracterización molecular mediante clonación y secuenciación de regiones ITS33	
5.4. Análisis filogenético.....	36
6. DISCUSIÓN .....	42
CAPÍTULO 7 .....	48
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	48
BIBLIOGRAFIA .....	50

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 3.1. Parte del locus de ARN ribosomal. Regiones codificantes conservadas: 18S (subunidad pequeña), 28S (subunidad grande). Los espaciadores internos transcritos: ITS1 e ITS2 (cebadores externos), ITS3 e ITS4 (cebadores internos) (Cox *et al.* 2005).....25
- Figura 5.1: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de ensayos de gradiente de temperatura de productos de nested PCR de ITS. Se representa: Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; 1-8: *Trypanosoma evansi* (control positivo); U/ $\mu$ L taq: concentraciones unidades taq por microlitro..... 30
- Figura 5.2: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de nested PCR de ITS. Se representa en cada carril las muestras CMQ 58, CMQ 102, CMQ 117, CMQ 132, CMQ 136, CMQ 146 y CMQ 172 de izquierda a derecha. Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; C+: *Trypanosoma evansi* Venezuela..... 32
- Figura 5.3: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de nested PCR de ITS. Se representa en cada carril las muestras CMQ 73, CMQ 26 de izquierda a derecha. Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; C+: *Trypanosoma evansi* Venezuela ..... 33
- Figura 5.4 Placa LBP con 40 $\mu$ g/mL de Kanamicina y 40mg/mL de X-GAL, de la muestra CMQ 156 clonada. .... 34
- Figura 5.5 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR con cebadores internos de ITS para cada colonia. Carriles1-4 grupo de colonias de la muestra CMQ

102; carriles 5-8 grupo de colonias de la muestra CMQ 117; carriles 9-12 grupo de colonias de la muestra CMQ 132. Marcador 100bp: DNA Ladder Promega .....	35
Figura 5.6 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR con cebadores internos de ITS para cada colonia proveniente del animal CMQ58 en los carriles 1 a 9; Marcador 100bp: DNA Ladder Promega. ....	36
Figura 5.7 Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de ADN plasmídico de cada clon. En los carriles se representa al grupo de ADN plasmídico de la muestra CMQ 58, CMQ 102, CMQ 117, CMQ 132. CMQ 156. CMQ 172; Marcador: DNA Mass Ladder Promega	36
Figura 5.8 Filogenia basada en el análisis de máxima verosimilitud usando la región SSU rRNA de las muestras CMQ26, CMQ73, CMQ117.1, CMQ117.2, CMQ132, CMQ156, se usó como outgroup a <i>B. caudatus</i> . Los números corresponden al porcentaje evolutivo obtenido de 2000 repeticiones. ....	39

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Tamaño de bandas de diferentes especies de tripanosoma, usando cebadores ITS..	26
Tabla 3.2 Distribución geográfica, huéspedes y vectores de tripanosomosis.....	26
Tabla 4.2 Cebadores de la región ITS para <i>Trypanosoma sp</i> .....	35
Tabla 4.3 Protocolo de nested PCR para amplificación de las regiones ITS.....	35
Tabla 4.4 Condiciones para la reacción de la PCR anidada.....	35
Tabla 4.5 Componentes de la reacción de ligación con TOPO TA clonng.....	37
Tabla 5.1 Condiciones optimizadas para nested PCR de la región ITS de <i>Trypanosoma sp</i> .	42
Tabla 5.2 Especificaciones y resultados de las muestras de bovinos seleccionadas.....	43
Tabla5.3. Resultados del análisis de secuencia mediante la herramienta BLAST.....	48

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b>	
Especificaciones y resultados de las muestras de bovinos seleccionadas.....	56
<b>Anexo 2</b>	
Resultados de la secuenciación de muestras positivas a ITS en Trypanosoma sp. en formato FASTA.....	58

## ABREVIACIONES

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ELISA:** Técnica inmunoenzimática ELISA

**EMRAQ EP:** Empresa Pública Metropolitana de Rastro de Quito

**ITS:** Espacios transcritos internos

**IgG:** Inmunoglobulina G

**IgM:** Inmunoglobulina M

**OIE:** Organización Mundial de Sanidad Animal

**Nested PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa anidada

**SSU rRNA:** Subunidad pequeña del ARN ribosomal

**WOO:** Técnica de microhematocrito

## RESUMEN

La Tripanosomosis es una enfermedad que tiene un impacto negativo en la producción ganadera, debido a los síntomas que esta produce como anemia, fiebre, pérdida progresiva de peso, disminución de la producción de leche, infertilidad, abortos, trastornos de locomoción. Estudios anteriores han evidenciado a la enfermedad en la costa del Ecuador, por lo que en el presente trabajo se realizó la caracterización molecular del hemoparásito y a su vez se decidió realizar el análisis filogenéticos con el gen de la subunidad pequeña de ARN ribosomal (SSU rRNA), debido a que este codifica las subunidades de ARN (18S, 5.8S y 28S) separados por un espaciador de transcripción interna (ITS 3 e ITS 4), siendo estos conservados en todos los tripanosomas. Para el presente estudio, se tomaron 17 muestras de 216 analizadas mediante ELISA, las cuales fueron positivas a Woo (2/216) y a ELISA, las muestras fueron obtenidas del Camal Metropolitano de Quito. De estas se obtuvo 8 muestras positivas mediante Nested PCR de las cuales 6 muestras fueron compatibles con *T. theileri* con bandas de 800 a 900pb y 2 muestras amplificaron dos bandas cada una de 1000pb y 800bp compatibles con *T. evansi* y *T. theileri* respectivamente. Además mediante secuenciación y análisis por BLAST se evidencia la presencia de *T. theileri* en 5 muestras y con un 91% de identidad la presencia de *T. godfreyi* en una muestra. El análisis filogenético evidenció la presencia de distintos grupos de cepas del protozooario circulantes en Ecuador siendo que la región ITS para *T. theileri* es polimórfico por lo que se sugiere que existe evolución de la especie. Los resultados indican que al ser el primer reporte de *T. theileri* en Ecuador, contribuye a la comprensión de que en el país existe esta especie, lo cual ayudara a implementar estrategias de diagnóstico y control en la zona de estudio permitiendo disminuir la transmisión del parásito a bovinos sanos, protegiendo a la industria ganadera del país.

**Palabras clave:** TRIPANOSOMOSIS, SSU RRNA

## ABSTRACT

Trypanosomosis is a disease that has a negative impact on livestock production, due to the symptoms it produces such as anemia, fever, progressive weight loss, decreased milk production, infertility, abortion, locomotion disorders. Previous studies have evidenced the disease in the coast of Ecuador, so in the present work the molecular characterization of the hemoparasite was performed and in turn it was decided to carry out the phylogenetic analysis with the small subunit gene of ribosomal RNA (SSU rRNA), because it encodes the RNA subunits (18S, 5.8S and 28S) separated by an internal transcription spacer (ITS 3 and ITS 4), which are conserved in all trypanosomes. For the present study, 17 samples of 216 analyzed by ELISA, which were positive to Woo (2/216) and ELISA, were taken from the Camal Metropolitano de Quito.

8 positive samples were obtained by Nested PCR of which 6 samples were compatible with *T. theileri* with bands of 800 to 900 bp and 2 samples amplified two bands each of 1000bp and 800bp compatible with *T. evansi* and *T. theileri* respectively.

In addition, the presence of *T. theileri* in 5 samples and the presence of *T. godfreyi* in a sample with 91% identity were evidenced by BLAST sequencing and analysis

The phylogenetic analysis evidenced the presence of different groups of protozoan strains circulating in Ecuador. The results indicate that being the first report of *T. theileri* in Ecuador, contributes to the understanding that in the country exists this species, which will help to implement strategies of diagnosis and control in the study area allowing to reduce the transmission of the parasite to healthy cattle, protecting the cattle industry of the country.

**KEY WORDS: TRYPANOSOMOSIS, SSU RRNA**

## CAPÍTULO 1

### 1. Introducción

La tripanosomosis es una enfermedad causada por protozoarios del género *Trypanosoma*, descrita por primera vez en Latinoamérica en el año de 1919 por Leger y Vienne en Guyana Francesa, quienes en esa época demostraron que *Trypanosoma vivax* provocaba una mortalidad del 50% debido a la patogenicidad del parásito (Desquesnes 2004)

Estudios reportan inicialmente la enfermedad en África, pero debido a las importaciones de ganado y caballos en el siglo XVI el parásito se adaptó a otros continentes especialmente en zonas tropicales y subtropicales como Sur América donde este se expandió mediante moscas hematófagas y hoy en día es una enfermedad enzoótica en el continente (Desquesnes *et al.* 2001; Desquesnes 2004)

En 1931 y 1932 fue reportado en la costa atlántica de Colombia la muerte de 12000 cabezas de bovinos a causa de tripanosomosis durante el transcurso de dos años, siendo este uno de los reportes que sugirió el impacto económico que provoca la enfermedad y su importancia de crear estrategias de control en ese país (Virviescas 1932).

Wells *et al.* (1977) reportan en Ecuador, Paraguay y Perú una seroprevalencia del 22.5%, 40% y 14.5% respectivamente, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta con el antígeno de *Trypanosoma vivax*, constituyéndose este trabajo en el primer reporte del país de la tripanosomosis animal.

Los principales tripanosomas de importancia veterinaria son: *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, y *T. theileri*. (Soulsby 1987; Desquesnes *et al.* 2001; Dávila *et al.* 2003). En América del Sur varios estudios han confirmado la presencia de *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum* y *T. theileri*, mediante métodos moleculares en Bolivia, Brasil, Colombia y Perú (Rodrigues *et al.* 2003; Desquesnes *et al.* 2013). Según un estudio reciente en Venezuela realizado por Ramírez Iglesias *et al.* (2016) se reportó en el ganado una prevalencia del 50% de *T. evansi* y 30% de *Trypanosoma sp.*, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Según la OIE (2015) en Ecuador no hay reportes de la presencia de tripanosomosis en bovinos, sin embargo un estudio realizado por Ortega (2014) en un centro de faenamiento de Quito reportó mediante PCR una prevalencia del 30,26% (46/152) de casos positivos a *T. vivax* en el ganado ecuatoriano, lo cual permite evidenciar la importancia del estudio de tripanosomosis en Ecuador, y a su vez datos epidemiológicos confiables permitirán crear estrategias de control y un correcto tratamiento, con el fin de proteger la industria ganadera.

La presencia de *Trypanosoma theileri* en Sur América ha sido escasamente estudiada, por lo que no existen datos del protozoario en Ecuador, a pesar de que se le considera como parásito cosmopolita (Desquesnes 2004). Un estudio realizado por Garcia *et al.* (2011b) en búfalos de agua y bovinos, reportó una prevalencia de *T. theileri* en ganado del 30.4% y 5% en el pantanal de Brasil y Venezuela respectivamente.

Antiguamente a *T. theileri* no se le otorgaba mucha importancia debido a que se pensaba que no era patógeno, pero se ha visto en el ganado una prevalencia alta, debido a que en la mayoría

de casos la enfermedad se encuentra en fase crónica siendo esta asintomática por lo tanto el animal es portador del parásito permitiendo su disipación de manera imperceptible (Rodrigues *et al.* 2003; Desquesnes 2004).

*Trypanosoma theileri* al ser un protozooario flagelado que posee un cuerpo alargado (69  $\mu\text{m}$  a 109  $\mu\text{m}$  de longitud), y una parte posterior es rígida y afilada, es decir, en forma cónica ha facilitado su observación mediante la técnica de Woo (Woo 1970; Desquesnes *et al.* 2013). A su vez posee cromosomas que varían de tamaño desde aproximadamente 300 Kb a 2.2 Mb, y se ha visto que el género *Megatrypanum* tiene el gen 18S (rRNA) idénticos, por lo que varios trabajos se han enfocado en realizar estudios filogenéticos en este gen (Maudlin *et al.* 2004; Garcia *et al.* 2011a)

El mecanismo de transmisión del protozooario es mecánico y la transmisión se atribuye a tabános, considerando que esta puede ocurrir cuando las excreciones de la mosca (tábano) tienen contacto con heridas ocasionadas por mordeduras, o a su vez si el bovino ingiere a la mosca (Bose & Olbrich 1987).

Los signos clínicos causados por *T. theileri* no son evidentes por lo que la enfermedad puede estar presente durante varios años, hasta que esta pueda ser detectada en la sangre periférica o se haga evidente una anemia crónica (Ward *et al.* 1984).

El uso de drogas como aceturato de diminaceno (7mg/kg) ha permitido controlar la parasitemia causada por tripanosomas, siendo estas aplicadas en intervalos de 4 o 6 meses, pero el

desconocimiento de la enfermedad es lo que ha causado que esta se disipe en el ganado (Geerts & Holmes 1998; Desquesnes 2004).

En general la Tripanosomosis en Sur América tiene un alto impacto económico ya que ha causado un riesgo potencial para casi 350 millones cabezas de ganado, 1.8 millones de búfalos y 16 millones de caballos desde hace más de 30 años (Davila & Silva 2000)

Aunque los signos clínicos de la enfermedad sean esporádicos, la tripanosomosis debe ser evaluada y controlada junto con otras enfermedades como babesiosis y anaplasmosis, ya que al ser enfermedades parasitarias han causado grandes pérdidas económicas en la producción ganadera ya sea de leche o carne (OIE 2015).

## CAPÍTULO 2

### 2. OBJETIVOS

#### 2.1. Objetivo general

- Caracterizar *Trypanosoma sp.* mediante clonación y secuenciación de regiones ITS de diferentes aislados de Ecuador.

#### 2.2. Objetivos específicos

- Optimizar la prueba de Nested PCR para amplificar regiones ITS de *Trypanosoma sp.*
- Evaluar la presencia de *Trypanosoma sp.* en las muestras sanguíneas de ganado bovino obtenidas en la Empresa Pública Metropolitana de Rastro de Quito (EMRQ) usando los cebadores ITS.
- Seleccionar, clonar, secuenciar y analizar filogenéticamente muestras positivas a ITS de la población bovina.

## CAPITULO 3

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Tripanosomosis

##### 3.1.1. Generalidades

La tripanosomosis es una enfermedad zoonótica que afecta a humanos y animales, la cual es causada por protozoarios flagelados pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, que al ser parásitos obligados se encuentran en el plasma sanguíneo, linfa y varios órganos del hospedador (Davila & Silva 2000).

Estudios han reportado mayor incidencia de la enfermedad en zonas tropicales y subtropicales. En Sur América la enfermedad causada por *Trypanosoma vivax* en bovinos es conocida como “secadera”, “huequera”, “cacho hueco” por los síntomas que esta genera, como anemia, pérdida progresiva de peso y fiebre (Gonzatti *et al.* 2014). En el caso de *Trypanosoma evansi* se conoce a la enfermedad en equinos como “mal de caderas” y “surra” (Desquesnes 2004).

Los tripanosomas de mayor importancia veterinaria son *T. vivax*, *T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, y *T. theileri*, debido a las afectaciones económicas que han causado en la producción ganadera (Soulsby 1987; Batista *et al.* 2007)

Según varios reportes la enfermedad surgió en el continente Africano como lo registra Leger y Vienne (1919), desde entonces nació la importancia de estudiar la enfermedad ya que esta fue introducida por importaciones de ganado en otros continentes como Asia, Europa y América desde principios del siglo XVI (Desquesnes 2004).

### 3.2. Sintomatología de tripanosomosis

Los principales síntomas de la enfermedad en fase aguda incluyen anemia, pérdida progresiva de peso, disminución en la producción de leche, fiebre, infertilidad, hipertrofia en ganglios linfáticos y en algunos casos la muerte, sin embargo, la enfermedad generalmente se presenta en fase crónica siendo esta asintomática por lo tanto el animal es portador del parásito (Desquesnes 2004)

Por lo cual a la enfermedad se le puede diferenciar en tres periodos:

- Periodo prepatente.- en este periodo no se presentan signos clínicos, debido a que es la etapa de la infección parasitaria, es decir desde la inoculación del parásito hasta la detección de este o la presencia de signos clínicos. En bovinos puede durar de 9 a 59 días (Osório *et al.* 2008).
- Periodo Agudo.- Se manifiesta con anemia progresiva, fiebre y por alteraciones del número de eritrocitos, leucocitos y hematocrito, por lo cual es el periodo donde los síntomas de la enfermedad son latentes (Batista *et al.* 2007).
- Periodo crónico.- en los casos donde el animal no muere, la parasitemia se reduce, por lo que el animal no presenta signos clínicos a excepción de la anemia la cual sigue presente en la mayoría de casos (Desquesnes 2004).

Adicionalmente la tripanosomosis ha provocado alteraciones de ciclos estrales, abortos, crías con bajo peso, infecciones transplacentarias y desordenes hormonales según un estudio realizado en becerros (Meléndez *et al.* 1993).

En el caso de la infección por *Trypanosoma theileri* generalmente esta no presenta signos clínicos, lo que permite una mayor parasitemia y dispersión del parásito a través de varios órganos y del sistema nervioso central (Desquesnes 2004). A su vez se debe considerar que la enfermedad al ser asintomática puede estar presente por años, hasta que esta pueda ser detectada en la sangre periférica o hasta que se haga evidente una anemia crónica que esta puede causar (Ward *et al.* 1984). Además es importante considerar que la infección por otros hemoparásitos aumenta la patogenicidad de *Trypanosoma theileri* provocando en ocasiones abortos y muerte en terneros (Ward *et al.* 1984).

En estudios realizados con *Trypanosoma evansi* los síntomas descritos anteriormente no son severos en bovinos, sin embargo en algunos casos existen alteraciones a nivel del sistema nervioso, como por ejemplo convulsiones y agresividad (Payne *et al.* 1993; Desquesnes *et al.* 2013).

Se debe considerar que dependiendo del estado nutricional, estado inmune, raza y edad del bovino los síntomas pueden presentarse o no, a pesar de que el parásito esté presente en el animal (Desquesnes 2004).

### **3.3. Morfología**

#### **3.3.1. *Trypanosoma evansi***

(Hoare 1972) y (Desquesnes 2004) describen a *Trypanosoma evansi* como un protozooario flagelado monomórfico que posee un cuerpo delgado de tamaño mediano (24  $\mu\text{m}$  de longitud), con un flagelo de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo y membrana ondulante desarrollada. Su kinetoplasto se

posiciona lejos de la parte posterior y mide 0.6  $\mu\text{m}$  por lo que al ser muy pequeño suele ser imperceptible.

El kinetoplasto en ocasiones no está presente por lo que se puede confundir con *Trypanosoma equiperdum* (Desquesnes 2004).

### 3.3.2. *Trypanosoma theileri*

Es un protozooario flagelado de cuerpo alargado en comparación a los otros tripanosomas (69  $\mu\text{m}$  a 109  $\mu\text{m}$  de longitud), tiene un ancho aproximado de 1.4  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ , con un flagelo libre de 4  $\mu\text{m}$  a 26  $\mu\text{m}$  y una membrana ondulante desarrollada (Desquesnes 2004).

La parte posterior del tripanosoma es rígida y afilada, que le da una forma cónica por lo que mediante la técnica de Woo se facilita su observación (Woo 1970; Desquesnes *et al.* 2013). Posee un kinetoplasto grande (1.1  $\mu\text{m}$ ), situado lejos de la parte posterior y a su vez cerca del núcleo (Myler 1993).

## 3.4. Taxonomía

### 3.4.1. *Trypanosoma evansi*

Orden: Kinetoplastida

Familia: *Trypanosomatidae*

Género: *Trypanosoma*

Subgénero: *Trypanozoon*

Especie: *Trypanosoma evansi* (Hoare 1972)

### 3.4.2. *Trypanosoma theileri*

Orden: Kinetoplastida

Familia: *Trypanosomatidae*

Género: *Trypanosoma*

Subgénero: *Megatrypanum*

Especie: *Trypanosoma theileri* (Hoare 1972)

### 3.5. Ciclo biológico de *Trypanosoma evansi*, *theileri* y *vivax*

El ciclo biológico de los tripanosomas es diferenciado de dos formas, la primera es mediante una transmisión cíclica únicamente a través de las moscas tse-tsé (*Glossina spp.*), y la segunda forma es mediante transmisión mecánica a través de las moscas del género *Tabanus* y *Stomoxys* (Soulsby 1987; Batista *et al.* 2007)

La transmisión cíclica tiene lugar en el probóscide de la mosca tse-tsé donde el tripanosoma se multiplica y madura cambiando de la forma tripomastigote (no infecciosa) a su fase tripomastigotes matacíclicos (infecciosa), en el tracto digestivo de la mosca, mediante fisión binaria (Desquesnes & Davila 2002).

En la transmisión mecánica por el contrario la multiplicación y maduración del protozooario en fase de tripomastigote se genera en el hospedador mediante fisión binaria, siendo que la mosca es quien únicamente transporta al parásito en fase tripomastigotes matacíclicos (infecciosa) una vez que el hospedador este infectado, por lo que esto ha permitido la migración del parásito a otros continentes desde África donde mayoritariamente se genera la transmisión cíclica (Shaw & Lainson 1972; Davila & Silva 2000).

Se debe considerar que a los tripanosomas se les agrupa en dos secciones: *Stercoraria*, en el cual el parásito se desarrolla en la parte posterior del tracto digestivo del insecto, en esta

sección se encuentra *Trypanosoma cruzi*, y *Salivaria* en el cual el parásito se desarrolla en la parte anterior del tracto digestivo del insecto, en esta sección se encuentran los tripanosomas de importancia clínica veterinaria como *T. evansi* y *T. vivax* (Osório *et al.* 2008).

Según (Shaw & Lainson 1972) y (Desquesnes 2004) el ciclo biológico de *T. vivax* se puede generar de dos formas, la primera es mediante una transmisión cíclica a través de las moscas tse-tsé (*Glossina spp.*), y la segunda forma es mediante transmisión mecánica a través de las moscas del género *Tabanus* y *Stomoxys*.

El ciclo biológico de *Trypanosoma evansi* es únicamente mecánico a través de las moscas del género *Tabanus*, *Stomoxys*, pero a su vez se ha observado su transmisión por murciélagos en Sur América (Hoare 1972; Desquesnes *et al.* 2013)

El hemoparásito *Trypanosoma theileri* es transmitido por tabános, por lo que se ha visto una alta prevalencia alrededor del mundo (Bose & Olbrich 1987). La transmisión puede ocurrir cuando las excreciones de la mosca (tábano) tienen contacto con heridas ocasionadas por mordeduras, o a su vez si el bovino ingiere a la mosca (Bose & Olbrich 1987).

### **3.6. Características moleculares**

Los tripanosomas presentan una red concatenada de ADN mitocondrial llamada kinetoplasto, el cual está dentro de la matriz mitocondrial. Este está conformado de estructuras circulares: mini círculos y maxi círculos (Maudlin *et al.* 2004).

Aproximadamente tienen de 5000 a 10000 mini círculos de aproximadamente 1000 pb, en el caso de *Trypanosoma evansi* se ha visto que estas secuencias son conservadas (Pollard *et al.*

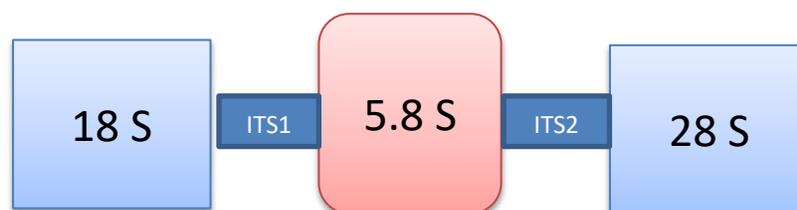
1990). Los mini círculos codifican ARN que permite el procesamiento del ARN mitocondrial (Maudlin *et al.* 2004).

En todos los tripanosomas a excepción de *Trypanosoma evansi* tienen de 50 a 100 maxi círculos con un tamaño aproximado de 20Kbp, siendo estos los que codifican a genes mitocondriales encargados de la producción de energía, necesarios para el desarrollo y diferenciación del protozooario en el vector (*Glossina sp*) (Maudlin *et al.* 2004)

*Trypanosoma evansi* al no poseer maxi círculos, no puede cumplir con la transmisión cíclica en las moscas del género *Glossina* (Hoare 1972; Borst *et al.* 1987).

Por otro lado *Trypanosoma theileri* posee cromosomas que varían de tamaño desde aproximadamente 300 Kb a 2.2 Mb, y se ha visto que el género *Megatrypanum* tiene el gen 18S (rRNA) idénticos, por lo que varios trabajos se han enfocado en realizar estudios filogenéticos en este gen (Maudlin *et al.* 2004; Garcia *et al.* 2011a)

Análisis filogenéticos en tripanosomas se realizan mediante secuencias divergentes que tiene el gen de la subunidad pequeña de ARN ribosomal (SSU rRNA), ya que este codifica las subunidades de ARN (18S, 5.8S y 28S) separados por un espaciador de transcripción interna (ITS 3 e ITS 4), siendo estos conservados en todos los tripanosomas (McLaughlin *et al.* 1996).



**Figura 3.1.** Parte del locus de ARN ribosomal. Regiones codificantes conservadas: 18S (subunidad pequeña), 28S (subunidad grande). Los espaciadores internos transcritos: ITS1 e ITS2 (Cox *et al.* 2005).

Los espaciadores internos transcritos (ITS), son regiones conservadas, variables en tamaños según la especie, por lo que se ha permitido su uso en análisis filogenéticos y determinación de identidad taxonómica como marcadores genéticos para la diferenciación de especies en tripanosomas (Desquesnes & Davila 2002).

Cox *et al.* (2005) menciona en su trabajo que el uso de las regiones ITS como cebadores permitió la detección y diferenciación de cada especie de tripanosoma como se observa en la tabla 3.1.

**Tabla 3.1**

Tamaño de bandas de diferentes especies de tripanosoma, usando cebadores ITS (Cox *et al.* 2005)

Especie	Tamaño de banda (NCBI)	Tamaño de banda obtenido por Cox (2005)
<i>Trypanosoma evansi</i>	1095pb	-
<i>Trypanosoma theileri</i>	988 pb	998 pb
<i>Trypanosoma vivax</i>	611 pb	620 pb

### 3.7. Epidemiología y filogenia de *Trypanosoma sp.*

En África se ha reportado que la tripanosomosis ha afectado a 37 países amenazando a 48 millones de bovinos (Desquesnes *et al.* 2013).

*Trypanosoma vivax* al ser uno de los hemoparásitos de mayor importancia clínica veterinaria en un principio se encontraba distribuida principalmente en África, pero en los últimos años se ha

visto que también es enzoótica en Sur América debido a las importaciones de ganado y caballos, siendo sus hospederos silvestres (artiodáctilos, perisodáctilos), además de sus hospedadores domésticos (ganado vacuno, ovejas, cabras, caballos, camélidos, burros y asnos) (Desquesnes 2004)

A nivel mundial los tripanosomas se encuentran distribuidos como se muestra en la tabla 3.2

**Tabla 3.2**

Distribución geográfica, huéspedes y vectores de tripanosomosis (Desquesnes 2004).

<b>Género de <i>Trypanosoma</i></b>	<b>Distribución geográfica</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Vector</b>
<i>T. vivax</i>	Occidente, Oriente, África, Centro y América del Sur	Ovejas, bovinos, cabras, ciervos, alpacas, búfalos de agua	Moscas de género <i>Glossina</i> , <i>Tabanus</i> y <i>Stomoxys</i>
<i>T. evansi</i>	Centro y América del Sur, África del Norte	Caballos, bovinos, perros, búfalos de agua, murciélagos, capibaras, ovejas, cabras.	Moscas del género <i>Tabanidae</i> , <i>Stomoxys</i> y por <i>Desmodus rotundus</i>
<i>T. theileri</i>	África, Europa y América	Bovinos y búfalos de agua	Moscas del género <i>Tabanidae</i>
<i>T. brucei</i>	Occidente, Oriente y parte central de Suráfrica	Antílopes, equinos, bovinos, perros, ovejas, cerdos	Moscas del género <i>Glossina</i>

---

cabras, y  
humanos.

---

Según Hoare (1972), el primer *Trypanosoma* patógeno en ser reportado fue *Trypanosoma evansi* en camellos y caballos, en la India. *T. evansi* se encuentra con mayor prevalencia en caballos, asnos, perros y búfalos de agua, siendo que en Sur América el parásito ha sido identificado en Bolivia, Venezuela, Brasil mediante métodos moleculares (Desquesnes *et al.* 2013).

Por otro lado estudios han demostrado la existencia de tripanosomosis causada por *T. vivax* en Sur América a partir de 1919, donde Leger y Vienne descubrieron la enfermedad en Guyana Francesa en bovinos (*Bos indicus*) (Davila & Silva 2000).

Desde entonces la enfermedad ha sido estudiada por las afectaciones que esta provoca, en América, *T. vivax* se encuentra principalmente en cebús (*Bos indicus*), taurinos (*Bos taurus*) y sus cruza, ovejas (*Ovis aries*) y cabras domésticas (*Capra hircus*), existiendo también algunos estudios en América del Sur donde se ha reportado que el único animal salvaje que puede ser infectado es el venado (*Odocoileus gymnotis*) (Desquesnes 2004)

En América del Sur *T. theileri* ha sido poco estudiada, y la mayoría de reportes son de Europa y África. En Surinam y la Guyana francesa se ha reportado una prevalencia de 11.9% y 7.6% (Van Vlaenderen 1996; Desquesnes 2004)

Estudios basados en el análisis de la subunidad ribosomal pequeña han permitido la orientación filogenética de *Trypanosoma sp.*, así se ha podido ubicar a todos los tripanosomas en el grupo *Salivaria* (Ohkanda *et al.* 2004).

Muchas especies de tripanosomas han sido caracterizadas por diferencias morfológicas, hospedador al cual infectan, así como los síntomas que causan y según el territorio geográfico en el que se encuentren, por ello es que según Rodrigues *et al.* (2003) sugiere que *T. theileri* tiene un cierto grado de especificidad por el huésped en un estudio que se realizó en ganado bovino y búfalos de agua.

Además concluye en un estudio realizado en el año 2006 que el clado de *T. theileri* comprende a un taxón con linajes asociados a la especie hospedadora y el origen geográfico (Rodrigues *et al.* 2006).

Se realizó un estudio que permitió relacionar filogenéticamente a *T. vivax* de Sur América con el Este y Oeste de África, encontrándose que los aislados de Sur América y el Oeste de África estaban estrechamente relacionados, lo que no pasó con el Este de África donde se encontró una distancia genética, lo que sugiere una diversidad genética entre *T. vivax* (Nakayima *et al.* 2013).

### **3.8. Métodos de diagnóstico**

Para el diagnóstico de tripanosomosis se utilizan técnicas clínicas, serológicas y moleculares dividiéndose estas en:

#### **3.8.1. Métodos directos**

##### **Prueba de Woo**

Esta técnica es la más usada por razones de tiempo al momento de diagnosticar *Trypanosoma sp.* en sangre. Consiste en separar la sangre en tres fases dependiendo de su gravedad específica mediante la centrifugación del hematocrito, permitiendo observar al protozoario en

la capa leucocitaria, esto ocurre por la similitud de la densidad del *Trypanosoma sp*, y la capa leucocitaria (Woo 1970).

El corto tiempo al realizar la prueba y el bajo costo son las ventajas que han permitido usar la técnica para obtener rápidamente resultados. Las desventajas se centran en la experticia del operador al momento de visualizar al hemoparásito, y el riesgo de contaminación (Desquesnes 2004)

La sensibilidad de la prueba radica en la parasitemia que tenga el animal, debido a que mayor parasitemia (>700 parásitos/mL) la sensibilidad es del 100%. Se ha visto que en promedio la prueba tiene una sensibilidad de  $200 \pm 100$  tripanosomas/mL (Desquesnes *et al.* 2001)

### **3.8.2. Métodos moleculares**

Dentro de los métodos moleculares, se encuentra la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual ha permitido el análisis de ADN extraído de animales infectados, considerando que la técnica amplifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU) permitiendo identificar y diferenciar las especies de tripanosomas clínicamente importantes, siendo este un método sensible en comparación con otros, ya que reporta una información detallada siendo esta una herramienta viable (Cox *et al.* 2005).

La ventaja del método de PCR es la alta sensibilidad y especificidad siendo esta de 1 hemoparásito por mL de sangre (Desquesnes 2004).

Según el tripanosoma en estudio, existen cebadores específicos como TVWJ1 y TCWJ2 para *T. vivax*, ESAG para *T. evansi*, entre otros (Clausen *et al.* 1998).

En un estudio realizado por (Cox *et al.* 2005), utilizó cebadores con las regiones ITS, mediante una PCR anidada la cual comprende dos rondas de amplificación con cebadores internos (ITS3

e ITS4) y cebadores externos (ITS1 e ITS2), permitiendo la identificación de cualquier especie de tripanosoma.

La desventaja de esta técnica son los altos costos lo cual no permite que sea una herramienta de diagnóstico rutinario (Desquesnes & Davila 2002).

Otras técnicas que se han utilizado en los últimos años son: PCR de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), amplificación isotérmica en bucle (LAMB) (Geysen *et al.* 2003).

### **3.9. Hipótesis**

Existe mayor especificidad y sensibilidad usando regiones ITS para diferenciar *Trypanosoma sp* en los diferentes aislados de Ecuador.

## CAPITULO 4

### 4. METODOLOGÍA

#### 4.1. Instituciones participantes

1. La Empresa Metropolitana Pública Rastro de Quito (EMRAQ), permitió la recolección de muestras sanguíneas de origen bovino, y a su vez contribuyeron con personal veterinario para desarrollar el trabajo de campo.
2. Laboratorios de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, donde se realizó el procesamiento y análisis de las muestras de sangre de origen bovino debido a que este forma parte del proyecto Prometeo: “Identificación y caracterización molecular de los principales hemotrópicos de un gran impacto económico en la ganadería bovina del Ecuador”.

#### 4.2. Personas cooperantes

Dr. Armando Reyna PhD (Prometeo-ESPE)

María Augusta Chávez MSc (ESPE)

Ing. Zulay González (ESPE)

Dr Ramiro González (EMRAQ)

Estudiantes de zootecnia Elvis Morales y Tomás Albán (EMRAQ)

#### 4.3. Fase de campo

La fase de campo se realizó en la Empresa Metropolitana Pública Rastro de Quito (EMRAQ) ubicada en la ciudadela La Ecuatoriana, calle Camilo Orejuela, ciudad de Quito, provincia de Pichincha.

Durante los meses de Abril a Junio se recolectaron 216 muestras de sangre en el ganado bovino provenientes de la costa mediante una punción en la vena caudal localizada en la vena coccigüea, para lo cual se procedió a limpiar y desinfectar la zona de punción, luego se extrajo la sangre usando tubos BD Vacutainer® de 5 ml con anticoagulante EDTA y aguja calibre 21. Las muestras fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

#### **4.4. Fase de laboratorio**

##### **4.4.1. Prueba de Woo**

Es una técnica que se basa en la separación de los diferentes componentes de la muestra de sangre dependiendo de su gravedad específica mediante la centrifugación del tubo de hematocrito, permitiendo observar al protozoario en la capa leucocitaria con la ayuda de un microscopio (Woo 1970).

##### Procedimiento

- Se tomó 60  $\mu\text{L}$  de sangre fresca en un tubo capilar heparinizado (75x1.5 mm)
- Se selló un extremo del capilar con plastilina para evitar que haya fuga de la muestra sanguínea.
- Luego se colocó los tubos capilares en la micro centrifuga a 10000 r.p.m durante 5 minutos.
- Una vez centrifugado se examinó la interfase celular plasma/leucocitos (capa leucocitaria) girando el tubo lentamente. El movimiento del tripanosoma se puede observar más claramente utilizando las lentes objetivo de 10 o 20X.

##### **4.4.2. Extracción manual de ADN a partir de sangre total**

La extracción de ADN se realizó utilizando el protocolo del Centro de Terapia Génica, Brno, República Checa, modificado, por Albán & Tamayo (2009).

### Procedimiento

- En un tubo de 1,5 mL se colocó 500  $\mu$ L de una muestra de sangre en EDTA y se congeló a -80 grados  $^{\circ}$ C por un tiempo mínimo de 20 minutos.
- Después se descongeló a temperatura ambiente, se añadió 1 mL de agua destilada grado biología molecular y se agitó las muestras por 5 minutos en un agitador tipo orbital.
- Se comprobó que exista lisis completa de los eritrocitos y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C.
- El sobrenadante se retiró con cuidado de no alterar el pellet y se repitió nuevamente los pasos anteriores.
- Se resuspendió el pellet en 500 $\mu$ L de suero fisiológico y se mezcló por inversión.
- Luego se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 $^{\circ}$ C y se descartó el sobrenadante.
- Se adicionó 1 mL de buffer de lisis (CTAB 2%, Tris-HCL 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, pH 7.5), 10  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL) y posteriormente se homogenizó mediante vortex para incubar con agitación a 70 $^{\circ}$ C por 1 hora.
- Luego nuevamente se homogenizó por agitación y se llevó a incubar a 95 $^{\circ}$ C por 15 minutos para inactivar la proteinasa K.
- Se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y se colocó el sobrenadante (1 mL) en un nuevo microtubo de 2 mL.
- Se colocó 700  $\mu$ L de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se homogenizó mediante un orbital para centrifugar a 10000 rpm por 15 minutos.

- Se removió el sobrenadante y se colocó en un nuevo microtubo de 1.5mL. Se completó el volumen del tubo con etanol frío al 100% y se mezcló suavemente invirtiendo los tubos, para después dejar reposar 30 minutos a -20°C.
- Las cadenas de ácidos nucleicos se colectaron por centrifugación a 14.000 rpm por 30 minutos a 4° C y descartando con pipeta el sobrenadante
- Luego se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14.000 rpm por 15 minutos.
- Se descartó el sobrenadante, y se dejó secar el pellet dentro de la cabina de bioseguridad abiertos por 20 minutos para que se evapore el etanol.
- Por último se diluyó el pellet en 100 µL de Tris-borato EDTA (TE), dejando a 65° C por 20 minutos con agitación frecuente. Finalmente las cadenas de ácidos nucleicos fueron almacenados a -20° C.

#### **4.4.3. Cuantificación de ADN**

El ADN extraído fue cuantificado por espectrofotometría UV, mediante el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) Se realizaron las mediciones de absorbancias a 260 y 280. Para lo cual se siguió los siguientes pasos:

- Se limpió con 2 µL de HCl 0.5M y 2 µL agua destilada la zona donde se debe colocar la muestra. Una vez limpio, se colocó 2 µL de buffer TE como solución blanco.
- Se colocó 2 µL de muestra y se procedió a cuantificar la concentración de cada una, tomando en cuenta que se debe limpiar la zona superior e inferior del pedestal con papel filtro cada vez.

#### **4.4.4. Identificación de muestras positivas a *Trypanosoma sp.***

La identificación de muestras positivas a *Trypanosoma sp* se realizó mediante el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada (Nested PCR) utilizando cebadores que amplifican la región ITS.

#### 4.4.4.1. Optimización de Nested PCR

Las reacciones fueron realizadas con un volumen final de 25  $\mu$ L, y las concentraciones utilizadas se encuentran detalladas en la tabla 4.2

El diseño de los cebadores externos (ITS1 e ITS2) y los cebadores internos (ITS3 e ITS4), se basaron del trabajo realizado por (Cox et al, 2005). Para la primera reacción se utilizó los cebadores ITS1 e ITS2, y para la segunda reacción se utilizó los cebadores ITS3 e ITS4, en esta segunda reacción se tomó 1  $\mu$ L del producto de PCR de la primera reacción y se colocó en tubos que contenían 24  $\mu$ L de mezcla de reacción fresca para PCR.

**Tabla 4.6**

Cebadores de la región ITS para *Trypanosoma sp.* (Cox et al, 2005).

Cebador	Secuencia
ITS1	5'-GAT TAC GTC CCT GCC ATT TG- 3'
ITS2	5'-TTG TTC GCT ATC GGT CTT CC- 3'
ITS3	5'-GGA AGC AAA AGT CGT AAC AAG G-3'
ITS4	5'-TGT TTT CTT TTC CTC CGC TG- 3'

ITS: espaciadores internos transcritos

**Tabla 4.7**

Protocolo de nested PCR para amplificación de las regiones ITS (Cox et al. 2005).

Reactivo	Stock	Concentración final	Volumen ( $\mu$ L)
H2O	N/A		14,15
Buffer	10x	1x	2,5
MgCl2	50 mM	1.5mM	0.75
Primer ITS1	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5

<b>Primer ITS2</b>	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	2,5
<b>dNTP</b>	40 mM	0,8 mM	0,5
<b>Taq</b>	5 U/ $\mu$ L	0.02 U	0.1
<b>ADN</b>			2
<b>Volumen Total</b>			<b>25 <math>\mu</math>L</b>

**Nested PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa anidada; **ITS:** espaciadores internos transcritos; **MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio; **dNTPs:** deoxinucleósido trifosfatos; **ADN:** ácido desoxirribonucleico;  **$\mu$ L:** microlitros; **U:** unidades; **mM:** milimolar

Las condiciones iniciales para la reacción de la PCR anidada fueron las siguientes:

#### **Tabla 4.8**

Condiciones para la reacción de la PCR anidada (Cox et al, 2005).

<b>Ciclo</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Repeticiones</b>
Desnaturalización inicial	95	7	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	55	1	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	$\infty$	

Para la optimización se realizó un gradiente de temperatura de 50°C hasta 60°C, y a su vez se realizó un ensayo con gradiente de concentraciones de *Taq* polimerasa de 0,02 U/ $\mu$ l a 1,25 U/ $\mu$ l.

El control positivo fue *T. evansi* donado por el laboratorio de la Universidad Simón Rodríguez de Venezuela.

Los productos de PCR fueron observados en un gel de agarosa al 1.5%, revelados con SyberSafe en una cámara de electroforesis vertical, corridos a 120V por una hora, y revelados a través del Transiluminador Bio Doc-IT™ System.

#### 4.4.5. Clonación

Una vez obtenidos los productos de PCR positivos se procedió a clonar, para lo cual se utilizó el vector TOPO TA vector Cloning (Invitrogen®) y las células químicamente competentes One shot TOP 10 (Invitrogen®).

El vector TOPO TA tiene una topoisomerasa I que funciona como una ligasa, es decir, que une extremos cohesivos de diferentes hebras de ADN, debido a que en el extremo 3' del vector existe una polideoxitimina y a su vez la *taq* polimerasa (Invitrogen® platinum) agrega una desoxiadenosina a los extremos 3' del producto de PCR, por lo tanto es capaz de reconocer extremos cohesivos y unirlos, ligando así el producto PCR al vector.

Por otra parte el vector al contener genes que otorgan la resistencia a la kanamisisina y a la ampicilina permite la selección de las colonias recombinantes.

Además por ello el vector contiene el gen *ccdB* fusionado al extremo C-terminal del gen *lacZα* lo cual da a conocer la eficacia de la clonación, ya que al momento de la ligación del producto de PCR la expresión del gen *lacZα* se ve interrumpida, por lo tanto una vez realizada la transformación se puede visualizar colonias blancas y azules, siendo estas últimas las que no tienen el vector ligado con el gen de interés. Para esto se utilizó X-gal el cual es un indicador de las células competentes que expresan la enzima β-galactosidasa siendo su promotor IPTG,

la cual provoca una coloración azul en las células que no tienen el plásmido ligado (Invitrogen).

#### 4.4.5.1. Ligación

Para la ligación del fragmento de interés se utilizó el vector TOPO TA y los productos de PCR positivos a Trypanosoma.

El procedimiento se realizó con los siguientes pasos:

- La reacción de ligación se realizó con el vector TOPO TA detallado en la tabla 4.5.
- Luego se mezcló la reacción de ligación gentilmente y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos
- Finalmente se colocó la reacción en hielo y se procedió a realizar la transformación, el sobrante de la reacción se conservó a -80 °C.

**Tabla 4.9**

Componentes de la reacción de ligación con TOPO TA clonig

Reactivo	Volumen
Producto de PCR fresco	2 $\mu$ L
Solución salina	1 $\mu$ L
Solución salina diluida	-
Agua	2 $\mu$ L
TOPO TA vector	1 $\mu$ L
<b>Volumen final</b>	<b>6 <math>\mu</math>L</b>

#### 4.4.5.2. Transformación

Para la transformación se utilizó las células competentes One shot TOP 10, y una placa selectiva para cada muestra.

Previamente a la transformación se colocaron las placas selectivas de LBP en la incubadora a 37°C por 45 minutos y se procedió a expandir 40µL de X-GAL 40mg/mL, y nuevamente se colocó en la incubadora hasta su uso.

Los pasos para la transformación fueron los siguientes:

- Las células competentes se colocaron en hielo, se añadió 2 µL de la reacción de ligación en las células competentes ( 50 µL ) y se mezcló suavemente y para proceder a incubar en hielo por 15 minutos
- El shock térmico se realizó trasladando las células a baño maria por 30 segundos a 42°C sin agitación e inmediatamente se colocó en hielo
- Se añadió 250 µL de medio SOC a temperatura ambiente y se incubo por 1 hora a 37 °C, agitando el tubo horizontalmente a 200 rpm

#### **4.4.5.3. Selección**

Para la selección se sembró 70 µL de cada transformación en las placas selectivas, las cuales se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Luego una vez evidenciada las diferentes colonias.

Se realizó la técnica de PCR con cebadores internos de ITS para cada colonia (colony PCR), considerando que se escogió tres colonias en cada placa y a su vez estas fueron sembradas en medio LB con 40µg/mL de Kanamicina.

#### **4.4.6. Extracción de ADN plasmídico**

Para la extracción del ADN plasmídico se usó el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit de la siguiente manera:

- Del cultivo celular se centrifugó 1,5 mL a 12000 rpm durante 2 minutos, y se eliminó el sobrenadante.
- Se suspendió con 250uL de Buffer R3 con RNasa A (provisto por el kit) y se homogenizó
- Luego se añadió 250uL de Buffer de lisis L7, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se añadió 350uL de Buffer de precipitación N4 y se mezcló por inversión vigorosamente hasta homogenizar y se centrifugó a 12000rpm durante 10 minutos.
- El sobrenadante se colocó dentro de la columna en un tubo de lavado de 2mL y se centrifugó a 12000rpm durante 1 minuto.
- Se descartó el sobrenadante y se añadió 500uL de Buffer de lavado W10 con etanol a la columna
- La incubación se realizó por 1 minuto a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- Después se añadió 700uL de Buffer de lavado W9 con etanol a la columna, se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante.
- La columna se colocó en un tubo nuevo de 1,5mL y se añadió 75uL de Buffer Te precalentado a 67°C en el centro de la columna.
- Finalmente se centrifugó la columna a 12000g por 2 minutos, y se almacenó el ADN plasmídico a -20°C.

#### **4.4.7. Amplificación de plásmidos a través de PCR**

Se realizó la amplificación de los fragmentos ligados al plásmido usando cebadores internos (ITS3 e ITS4). Las concentraciones usadas para cada reactivo se encuentran detalladas en la tabla 4.2 y las condiciones de ciclado en la tabla 4.3

#### 4.4.8. Secuenciación

El ADN plasmídico clonado fue enviado a Macrogen® Corea, donde se secuenció utilizando la técnica de Sanger, que consiste en utilizar dideoxinucleóticos macados con fluoróforos y se obtiene el resultado mediante una electroforesis capilar (Sanger & Coulson 1975).

Las secuencias fueron analizadas y alineadas con el programa DSGene 1.5 y Mega7, con el propósito de obtener secuencias consenso. A su vez los alineamientos fueron analizados mediante el método de verosimilitud y el modelo evolutivo adecuado fue obtenido por el programa Mega 7, el cual fue Kimura 2 parámetros. Debe considerarse que se tomaron 3 clones de cada clonación, cada uno generó 6 secuencias (3 sentido y 3 antosentido) estas secuencias debieron ser editadas una a una para que todas fueran del mismo tamaño y luego conformar las secuencias consenso respectivas para cada clonación.

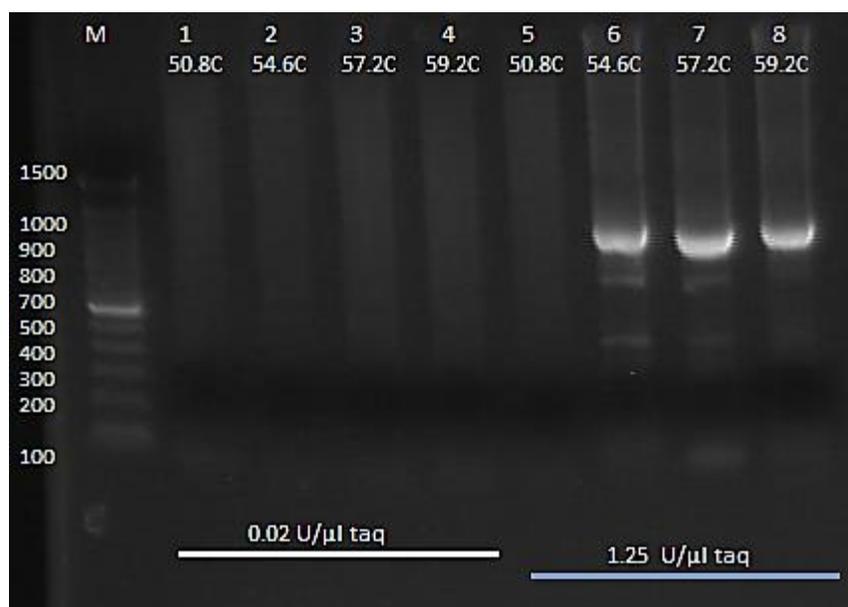
Las secuencias consenso fueron analizadas mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) y fueron comparadas con secuencias de la base de datos GenBank: *T. theileri* de bovino aislado de Brasil (AY773698), *T. theileri* aislado de ciervo Japón (AB569250), *T. brucei* (AL359782), *T. godfreyi* (AJ009155), *T. evansi* (D89527). *T. vivax* (U22316), *T. cruzi* Can III (AJ009148), *T. cruzi* VINCH89 (AJ009749) de esta forma se realizó el análisis filogenético, siendo el outgroup escogido para tripanosoma *Bodo caudatus* (X53910).

## CAPÍTULO 5

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Optimización de la técnica nested PCR

Para la optimización de la nested PCR se realizó ensayos con gradiente de temperatura desde 50°C hasta 60°C, y a su vez se realizó un ensayo con gradiente de concentraciones de *Taq* polimerasa de 0,02 U/μl a 1,25 U/μl como se observa en la Figura 5.1.



**Figura 5.1:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de ensayos de gradiente de temperatura de productos de nested PCR de ITS. Se representa: Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; **1-8:** *Trypanosoma evansi* (control positivo); **U/μL taq:** concentraciones unidades taq por microlitro.

La concentración de taq a la cual amplificó el fragmento usando los cebadores internos (ITS3 e ITS 4) fue de 1.25 U/μL siendo la temperatura optima de 59.2°C de esta manera se seleccionó las condiciones adecuadas para la nested PCR.

A continuación se detalla en la Tabla 5.1 las condiciones y concentraciones, optimizadas para la amplificación de la región ITS . Utilizando un volumen final de reacción de 25μL.

**Tabla 5.1**Condiciones optimizadas para nested PCR de la región ITS de *Trypanosoma sp.*

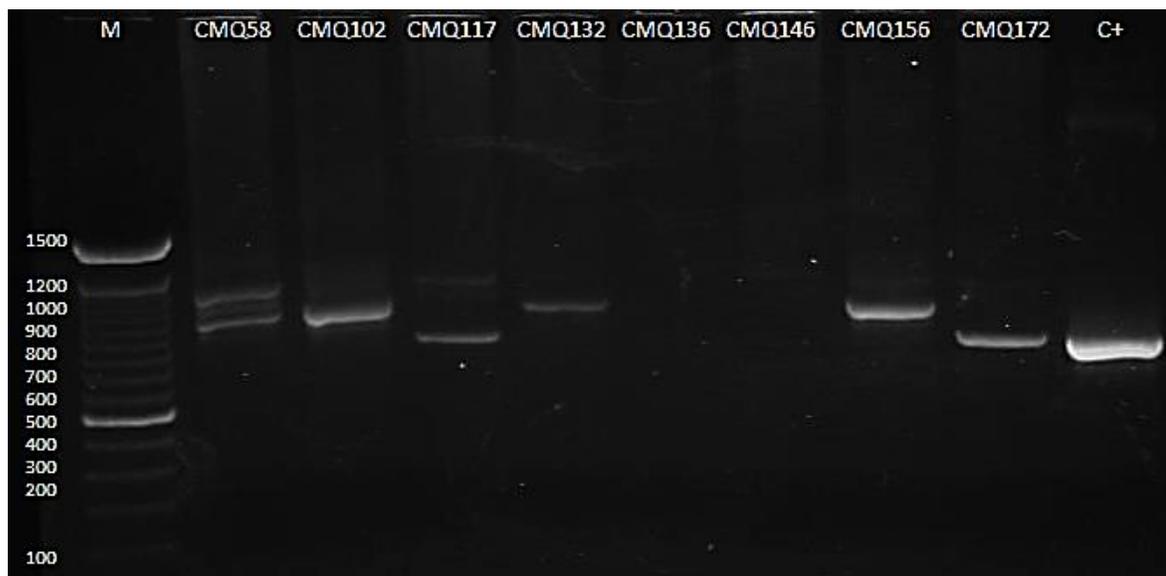
Reactivo	Stock	Concentración final	Volumen (µL)
H <sub>2</sub> O	N/A		14,00
Buffer	10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1.5mM	0.75
Primer ITS1	10 µM	1 µM	2,5
Primer ITS2	10 µM	1 µM	2,5
dNTP <sub>s</sub>	40 mM	0,8 mM	0,5
Taq	5 U/µL	1.25 U/µL	0.25
ADN			2
<b>Volumen Total</b>			<b>25 µL</b>

**Nested PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa anidada; **ITS:** espaciadores internos transcritos; **MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio; **dNTPs:** deoxinucleósido trifosfatos; **ADN:** ácido desoxirribonucleico; **µL:** microlitros; **U:** unidades; **mM:** milimolar

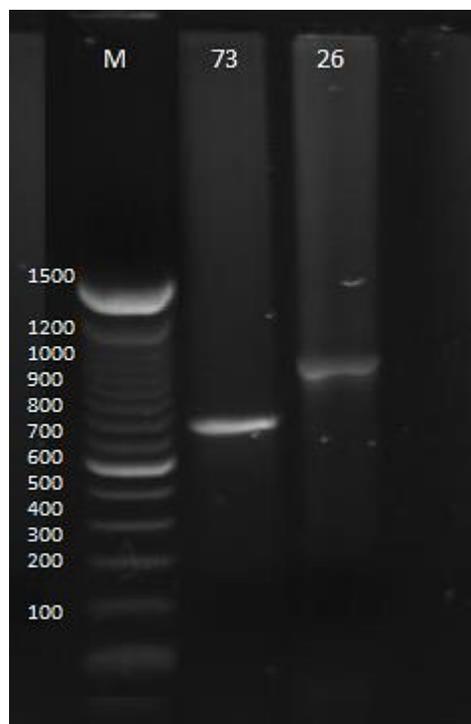
## 5.2. Evaluación de la presencia de *Trypanosoma sp.*

Un total de 216 muestras sanguíneas de bovinos fueron recolectadas en la Empresa Pública Metropolitana Rastro de Quito, de las cuales se realizó la extracción de ADN y además se analizaron mediante la técnica ELISA utilizando un extracto soluble de *T. evansi* como antígeno para la detección de anticuerpos IgG anti *Trypanosoma sp.* encontrándose 47.68% (103/216) positivos (González 2016).

Para el presente estudio, se tomaron al azar 17 muestras positivas a ELISA y las muestras positivas de Woo (2/216) de estas 8 fueron positivas a la prueba de Nested PCR, al mostrar amplicones de ITS (Figura 5.2 y Figura 5.3).



**Figura 5.2:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de nested PCR de ITS. Se representa en cada carril las muestras CMQ 58, CMQ 102, CMQ 117, CMQ 132, CMQ 136, CMQ 146 y CMQ 172 de izquierda a derecha. Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; C+: *Trypanosoma evansi* Venezuela.



**Figura 5.3:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de nested PCR de ITS. Se representa en cada carril las muestras CMQ 73, CMQ 26 de izquierda a derecha. Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; C+: *Trypanosoma evansi* Venezuela

Como se observa en la Figura 5.2 y Figura 5.3 se obtuvieron fragmentos de diferente tamaño por lo que posiblemente existen diferentes especies de *Tripanosoma*, en seis muestras (CMQ26, CMQ80, CMQ102, CMQ132, CMQ156, CMQ172) se evidenciaron bandas de 800-900pb compatibles con *T. theileri*, en dos muestras (CMQ 58, CMQ 117) presentaron dos bandas amplificadas de distinto tamaño aproximado de 1000pb y 800bp, por lo que posiblemente se trate de *T. evansi* y *T. theileri* respectivamente Anexo 1.

### 5.3. Caracterización molecular mediante clonación y secuenciación de regiones ITS

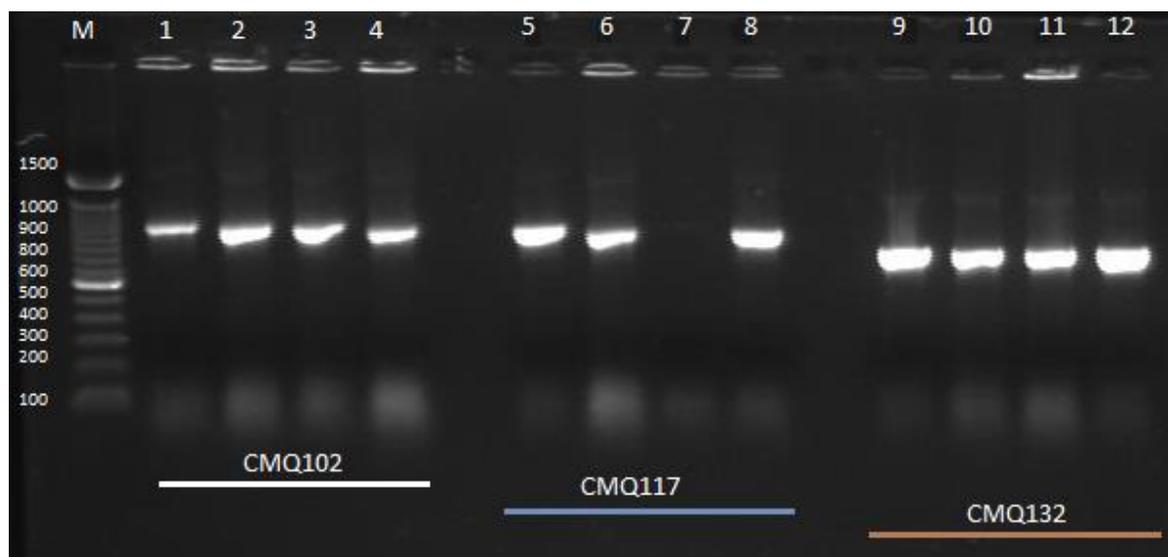
Las ocho muestras positivas (CMQ 26, CMQ 73, CMQ 58, CMQ 102, CMQ 117, CMQ 132, CMQ156, CMQ172) fueron ligadas al vector TOPO TA (Invitrogen), y posteriormente fueron colocadas en placas LBP con 40µg/mL de Kanamicina y 40mg/mL X-GAL. Se dejó incubar por 24 horas a 37°C y se observaron colonias blancas de las cuales se tomaron 5 de cada placa, como se observa en la Figura 5.3. De la muestra CMQ 58 se tomaron 10 colonias ya que esta amplificó dos fragmentos, del resto se tomaron 5 clones solamente.



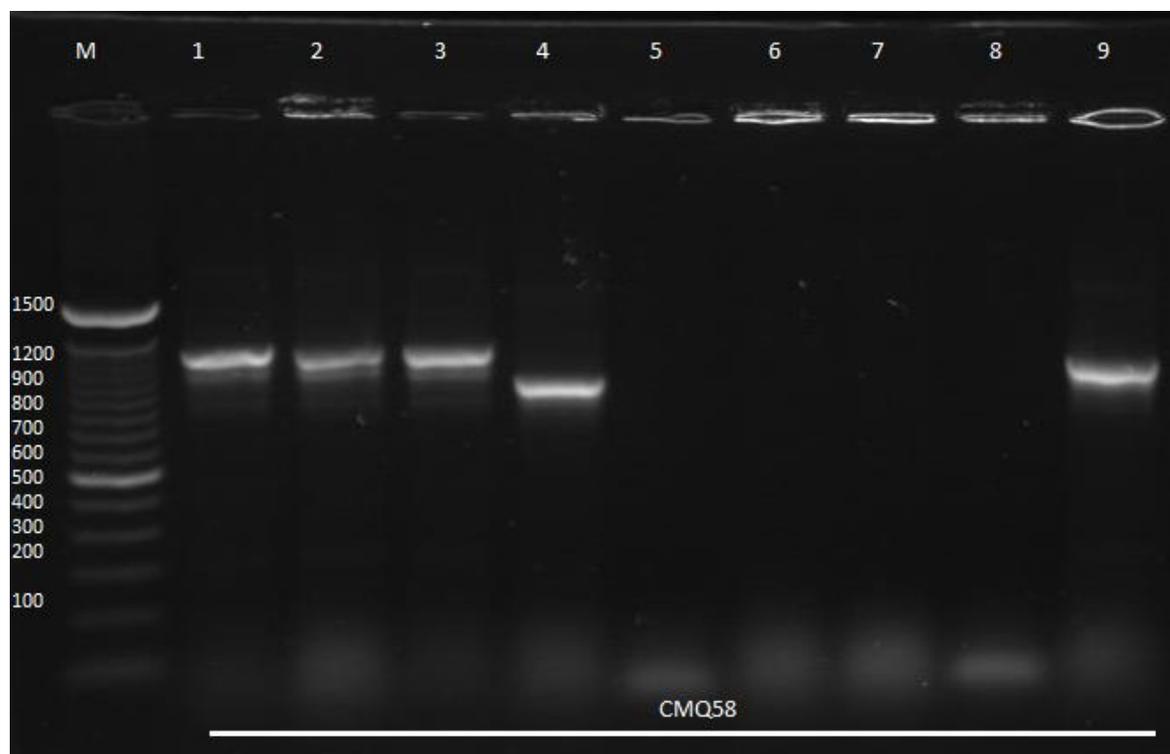
**Figura 5.4** Placa LBP con 40 $\mu$ g/mL de Kanamicina y 40mg/mL de X-GAL, de la muestra CMQ 58 clonada.

No se observaron colonias azules en las 8 placas, por lo tanto se evidencia la interrupción de la expresión del gen betagalactosidasa en las células Top 10.

Las colonias fueron colocadas en medio LB con 40 $\mu$ g/mL de Kanamicina y se dejó incubar por 24 horas a 37°C, a su vez al mismo tiempo se realizó la técnica de PCR con cebadores internos de ITS, para confirmar que el plásmido esté ligado. En una colonia de la muestra CMQ 117 no se observó ligación del plásmido al fragmento que contiene la subunidad pequeña de ARN ribosomal de tripanosoma, lo mismo ocurrió con 4 colonias de la muestra CMQ 58 como se observa en la Figura 5.4 y 5.5



**Figura 5.5** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR con cebadores internos de ITS para cada colonia. Carriles 1-4 grupo de colonias de la muestra CMQ 102; carriles 5-8 grupo de colonias de la muestra CMQ 117; carriles 9-12 grupo de colonias de la muestra CMQ 132. Marcador 100bp: DNA Ladder Promega

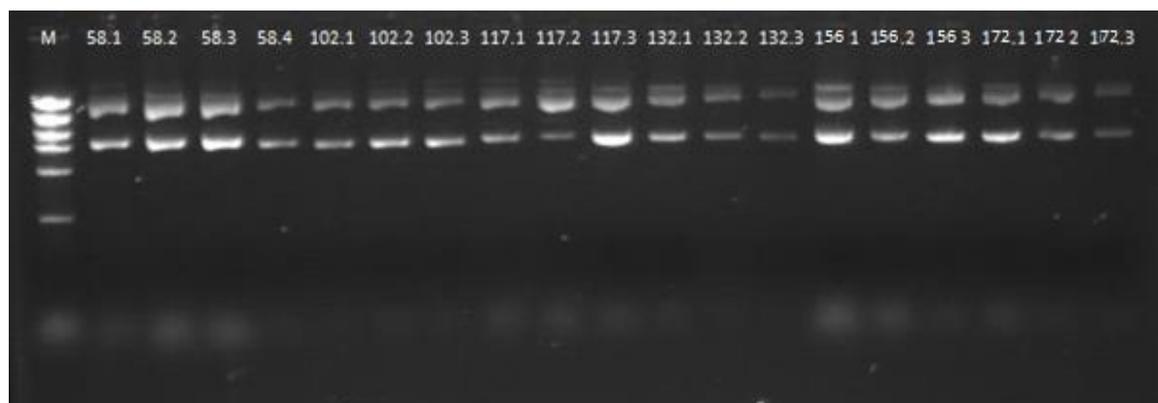


**Figura 5.6** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR con cebadores internos de ITS para cada colonia proveniente del animal CMQ58 en los carriles 1 a 9; Marcador 100bp: DNA Ladder Promega.

Por otra parte en la Figura 5.5 del grupo de colonias de la muestra CMQ 58 se ve claramente las dos bandas amplificadas de distinto tamaño, en el carril 4 de  $\approx 800$ pb y en los carriles 1,2,3 y 9 de  $\approx 1000$ pb por lo que posiblemente se clonaron dos especies diferentes de tripanosoma.

### Extracción del plásmido

Luego de la extracción del ADN plasmídico de las colonias que resultaron positivas, se evidencio la integridad del ADN plasmídico a través de un gel de agarosa al 0.8%, observándose en todos los casos la presencia de ADN (Figura 5.6). A su vez se cuantificó la concentración de ADN plasmídico el cual variaba de 200 a 1700 ng/ $\mu$ L.



**Figura 5.7** Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de ADN plasmídico de cada clon. En los carriles se representa al grupo de ADN plasmídico de la muestra CMQ 58, CMQ 102, CMQ 117, CMQ 132. CMQ 156. CMQ 172; Marcador: DNA Mass Ladder Promega

## 5.4. Análisis filogenético

Una vez purificados los ADN plasmídicos se envió 3 plásmidos de cada muestra a la empresa Macrogen Corea, de los cuales 6 fueron secuenciados. Obtenidas las secuencias de cada muestra, se construyó una secuencia consenso para cada grupo de clones (Anexo 2), para lo cual las secuencias fueron analizadas mediante la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Los resultados se demuestran en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3**

Resultados del análisis de secuencia mediante la herramienta BLAST

<b>Secuencia</b>	<b>Secuencia más similar (código de acceso)</b>	<b>Identidad (%)</b>	<b>E-value</b>	<b>Descripción de la secuencia más similar</b>
CMQ26	AB569250.1	99	0.0	Trypanosoma theileri genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2 and 28S RNA, strain: Esashi 12 Trypanosoma godfreyi isolate TS06134 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S
CMQ73	JN673385.1	91	2e-60	ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Trypanosoma theileri isolate Cow 104 clone
CMQ117.1	JX178187.1	99	0.0	CI 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA

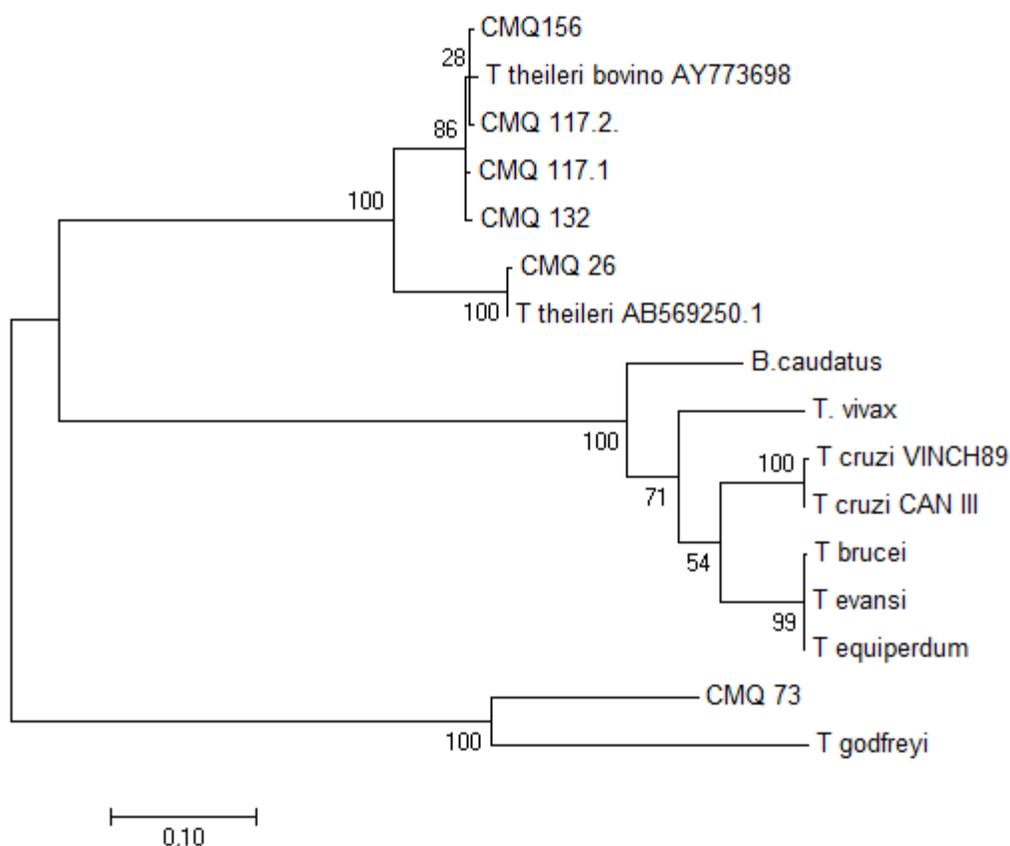
---

CMQ117.2	JX178163.1	99	0.0	gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence Trypanosoma theileri isolate Cow 2095 clone Cl 9 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2, partial sequence Trypanosoma theileri isolate Cow 104 clone Cl 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence Trypanosoma theileri isolate Cow 104 clone Cl 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence
CMQ132	JX178187.1	99	0.0	sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence Trypanosoma theileri isolate Cow 104 clone Cl 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence
CMQ156	JX178187.1	99	0.0	sequence; and internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence

---

Por otra parte las secuencias fueron analizadas mediante el programa Mega 7, a través del método de máxima verosimilitud y el modelo evolutivo Kimura 2 parámetros.

El resultado obtenido en el análisis de la región SSU rRNA de todas las muestras comparadas con otras secuencias de tripanosomas obtenidas de la base de datos GenBank, y el outgroup *B. caudatus* fue el siguiente:



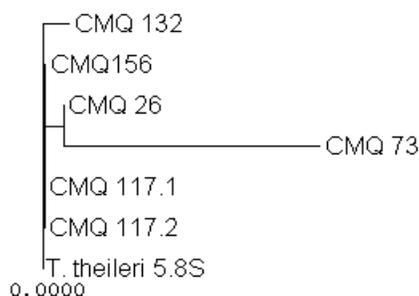
**Figura 5.8** Filogenia basada en el análisis de máxima verosimilitud usando la región SSU rRNA de las muestras CMQ26, CMQ73, CMQ117.1, CMQ117.2, CMQ132, CMQ156, se usó como outgroup a *B. caudatus*. Los números corresponden al porcentaje evolutivo obtenido de 2000 repeticiones.

Como se observa en la Figura 5.8, las muestras que evidenciaron ser *T. theileri* mediante el análisis BLAST, son monofiléticas en el clado de *T. theileri*, pero a su vez se demuestra que éstas son polimórficas, es decir, que no son homologas las regiones ITS, por lo que se

encuentran varios aislados de *T. theileri*. Se debe considerar que las muestras CMQ117.1, CMQ117.2 son aislados del mismo bovino por lo que probable que en un mismo huésped se encuentren diferentes aislados de la misma especie. A su vez la muestra CMQ 26 forma otra rama dentro del mismo clado, la cual tiene una similitud cercana con el aislado obtenido por GenBank AB569250.1.

Con respecto a la muestra CMQ73 esta tiene se encuentra alejada de las demás y tiene una similitud cercana a *T. godfreyi*.

El análisis del gen 5.8S de la región SSU rRNA para cada muestra con outgroup *T. evansi* es el siguiente.



**Figura 5.9** Filogenia basada en el análisis de máxima verosimilitud usando el gen 5.8S de la región SSU rRNA de las muestras CMQ26, CMQ 73, CMQ117.1, CMQ117.2, CMQ132, CMQ156, se usó como outgroup a *T. evansi*. Los números corresponden al porcentaje evolutivo obtenido de 1000 repeticiones.

El resultado del análisis filogenético de la región 5.8S, nos indica que la región es conservada observándose una mayor distancia con la muestra CMQ73 siendo esta diferente a las demás,

por lo que se presume que existe una inserción o delección de nucleótidos lo que ocasionó que estas sean distintas.

## CAPÍTULO 6

### 6. DISCUSIÓN

La Nested PCR, ha sido una herramienta utilizada con el fin de diferenciar e identificar a las diferentes especies de tripanosomas que son clínicamente importantes como es el caso de *T. vivax*, *T. evansi*, *T. theileri* debido a que esta amplifica la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU rRNA) (Cox *et al.* 2005). En el presente estudio se optimizó la Nested PCR, en base al protocolo establecido por (Cox *et al.* 2005), debido a que no siempre los protocolos establecidos funcionan eficazmente ya que las condiciones pueden ser distintas ya sea por los reactivos y equipos, por lo que se desarrolló la optimización de esta técnica con el fin de aumentar la fidelidad de la prueba, para lo cual se utilizó un gradiente de temperatura de hibridación, obteniendo el mejor resultado 59.2°C debido a que no se observaron bandas inespecíficas. McPherson and Møller (2007) mencionan que a medida que se aumenta la temperatura de hibridación es más eficaz la incorporación de dNTPs y se eliminan fragmentos inespecíficos. El otro parámetro que se optimizó fue la concentración de la Taq polimerasa la cual al someterla a altas temperaturas disminuye su actividad por lo que se debe añadir más cantidad de la enzima, como sucedió en el presente estudio ya que se incrementó de 0.02U/μL a 1.25 U/μL (McPherson & Møller 2007).

Es importante considerar que este protocolo permite la identificación de tripanosomas en presencia del ADN del huésped, considerando que otros métodos moleculares de detección de tripanosoma al ser específicos para cada especie, necesitan un ADN que tenga una buena concentración por lo que en algunos casos se debe recurrir a la inoculación en ratones y existe

la posibilidad de que los aislados de tripanosoma no sobreviven provocando que exista una pérdida de la información epidemiológica. (Hoare 1972; Cox *et al.* 2005)

Los métodos de diagnóstico parasitológicos utilizados para la detección de hemoparásitos en sangre son caracterizados por su baja sensibilidad, debido a que un número menor a 60 tripanosomas/mL de sangre crea falsos negativos (Desquesnes 2004). Estudios han demostrado que se observa mayor parasitemia de tripanosomosis usando el método de PCR, en comparación con otros métodos de diagnóstico como frotis con giemsa y Woo (Dávila *et al.* 2003). Considerando que en estos últimos la sensibilidad se ve afectada por el volumen de sangre a ser evaluada y por la experiencia del operador (Desquesnes & Davila 2002).

En el presente estudio se evidencia por primera vez la presencia de *T. theileri* en el ganado bovino de Ecuador, ya que de 17 muestras analizadas por Nested PCR y luego de la secuenciación se pudo constatar que 5 corresponden a la especie *T. theileri*. Es importante considerar que todas las muestras provienen de Santo Domingo de los Tsachilas en donde el clima húmedo y tropical favorece a la reproducción de la mosca transmisora (Desquesnes 2004). Este protozoario al ser cosmopolita se ha adaptado en todo el mundo a excepción de la Antártica (Hoare 1972). En Sur América se ha reportado su presencia en varios países, así lo demuestran los estudios realizados en Venezuela y Brasil donde se reportó una prevalencia de *T. theileri* en ganado del 30.4% y 5% respectivamente (Rodrigues *et al.* 2003). En otro estudio realizado por Jaimes-Dueñez *et al.* (2016) encontraron 50.9% de animales positivos a *T. theileri* en Colombia, por lo que se cree que la escasa sensibilidad de las herramientas de diagnóstico han permitido esta extensión (García *et al.* 2011a).

*T. theileri* ha sido poco estudiado ya que se pensaba que este no era patógeno debido a que experimentalmente se ha observado que los animales permanecen portadores sin mostrar signos clínicos durante un año o más, sin embargo estudios recientes demuestran que *T. theileri* se encuentra en mayor porcentaje en animales anémicos, por lo que se sugiere que este es un parásito oportunista y potencialmente patógeno cuando está asociado a otras infecciones (Jaimes-Dueñez *et al.* 2016). Además en los últimos años en Brasil han descrito que *T. theileri* provoca infecciones crónicas en ganado y búfalos de agua, siendo estas detectadas en hemocultivos, a su vez se ha visto que la patogenicidad aumenta cuando existen infecciones mixtas como por ejemplo con Babesia, y Anaplasma, también se ha observado alteraciones asociadas a la escasa nutrición, estrés y la gestación (Braun *et al.* 2002; Rodrigues *et al.* 2006).

Los resultados obtenidos mediante Nested PCR, sugieren que la enfermedad causada por este hemoparásito está presente en el país, por lo tanto el estudio a través de técnicas moleculares nos otorga resultados confiables ya que se demuestra que posiblemente el parásito tiene baja parasitemia en la sangre periférica ocasionando los falsos negativos en métodos de diagnóstico parasitológicos convencionales, como lo demuestran otros estudios donde se ha encontrado al parásito en mayor cantidad en el bazo, cerebro y ganglios linfáticos (Braun *et al.* 2002).

Los tripanosomas han sido caracterizados por sus diferencias morfológicas, hospedador al cual infectan, así como los síntomas que causan y el territorio geográfico en el que se encuentren, Rodrigues *et al.* (2003) sugiere que *T. theileri* tiene un cierto grado de especificidad por el huésped, además se ha demostrado que existe polimorfismo en esta especie debida a la variabilidad de las ITS, lo cual pudo ser analizado en varias muestras de ADN ambos estudios

realizados en ganado bovino y búfalos de agua de distintas regiones de Brasil (Rodrigues *et al.* 2006). Con respecto al presente estudio se puede corroborar esto debido a que se obtuvo como resultado secuencias polimórficas en el caso de los aislados que evidenciaron ser *T. theileri* (CMQ26, CMQ 117.1, CMQ117.2, CMQ132, CMQ156) (Figura 5.8), son monofiléticos en el clado de *T. theileri*, pero dentro del mismo clado se encuentran dos linajes siendo que la muestra CMQ 26 forma otra rama con la secuencia obtenida por GenBank (AB569250), por lo que este es un taxón complejo que puede comprender varios linajes que pareciera haber evolucionado, por lo que es importante realizar estudios más completos de distintas regiones donde exista el vector para conocer la relación huésped-parásito (Rodrigues *et al.* 2006).

Las muestras no son homologas entre sí, a excepción del gen 5.8S, por lo que posiblemente se asume que la región ITS al ser no codificante puede ser diferente en la misma especie considerando que cada tripanosoma tiene 100 copias de la misma región, por lo que se puede sospechar que en un mismo bovino existen tres aislados distintos de *T. theileri*. Así mismo es importante considerar que análisis moleculares filogenéticos en *T. theileri* han demostrado que el subgénero *Megatrypanum* es polifilético, es decir, que no poseen un antepasado en común a comparación con los demás miembros de la familia Trypanosomatidae (Braun *et al.* 2002; Rodrigues *et al.* 2006).

Además los resultados de este estudio revelaron que el gen 5.8S tiene una similitud robusta, es decir es conservado así como lo demuestra el estudio de filogenia realizado con aislados de Brasil, sin embargo se observa que la muestra CMQ73 no tiene una similitud fuerte con las

demás por lo que se presume que existe una inserción o delección de nucleótidos lo que ocasionó que esta sea algo distinta (Rodrigues *et al.* 2006). Es importante realizar estudios que permitan comprender la taxonomía de esta especie ya que posiblemente existan nuevos genotipos que pueden ser descubiertos en zonas inexploradas.

Un resultado sorprendente fue el que se obtuvo analizando la secuencia de la muestra CMQ 73 debido a que esta obtuvo un 91% de identidad con *Trypanosoma godfreyi* (Tabla 5.3), por lo que es importante considerar que los tripanosomas a pesar de que han demostrado una divergencia genética, solo a *Trypanosoma godfreyi* se le ha considerado como una nueva especie, por lo que se sugiere el estudio filogenético de este en el país (McNamara *et al.* 1994).

Siendo este último poco estudiado, se conoce que es patógeno en cerdos, debido a que es la fuente de alimento preferida por la mosca tse-tse lo que incrementa la oportunidad de transmisión en especial de *T. godfreyi*, pero esto sucede en Sur África y en Sur América no ha sido reportado por lo que no se conoce el vector que lo transmite así como los hospederos (McNamara *et al.* 1994).

En Ecuador son escasos los estudios que se han llevado a cabo de tripanosomosis en bovinos, uno de ellos fue mediante la técnica de ELISA utilizando un extracto soluble de *T. evansi* como antígeno para la detección de anticuerpos IgG anti *Trypanosoma sp.* donde se encontró una prevalencia del 47.68% (103/216) positivos (González 2016), otro estudio fue realizado por Ortega (2014) en un centro de faenamiento de Quito donde se reportó mediante PCR una prevalencia del 30,26% (46/152) de casos positivos a *T. vivax* en el ganado ecuatoriano, considerando que el primer

estudio fue realizado por Wells *et al.* (1977) donde se obtuvo 22.5% de casos positivos a *T. vivax*, por lo cual es importante seguir realizando estudios de otros subgéneros y especies.

Además es importante considerar que en el Censo Agropecuario Nacional (SICA, 2002) el Ecuador contaba con una población aproximada de 4.5 millones de bovinos de los cuales el 37% son de la región Costa. Tomando en cuenta el año en que se realizó el censo, hoy en día la población de bovinos debió aumentar, por lo que es crucial estudiar la enfermedad ya que las técnicas moleculares se usan con poca frecuencia para el estudio epidemiológico de este hemoparásito debido a que no se conoce el efecto patógeno en las zonas ganaderas, a pesar de que se conoce el alto impacto económico debido a que ha causado un riesgo potencial para casi 350 millones cabezas de ganado, 1.8 millones de búfalos y 16 millones de caballos desde hace más de 30 años (Davila & Silva 2000)

Finalmente al ser el primer reporte de *T. theileri* en Ecuador, contribuye a la comprensión de que en el país existe el parásito, lo cual ayudara a implementar estrategias de diagnóstico y control en la zona de estudio permitiendo disminuir la transmisión del parásito a bovinos sanos, protegiendo a la industria ganadera del país,

## CAPÍTULO 7

### 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 7.1. CONCLUSIONES

- La técnica de PCR anidada para regiones ITS de *Trypanosoma sp* fue optimizada con una concentración de Taq de 1.25 U/ $\mu$ L y a una temperatura de 59.2°C.
- Se obtuvo 8 muestras positivas mediante Nested PCR de las cuales 6 muestras (CMQ26, CMQ80, CMQ102, CMQ132, CMQ156, CMQ172) fueron compatibles con *T. theileri* con bandas de 800 a 900pb y 2 muestras (CMQ 58, CMQ 117) amplificaron dos bandas cada una de 1000pb y 800bp compatibles con *T. evansi* y *T. theileri* respectivamente
- En 5 muestras secuenciadas se obtuvo un 99% de identidad con *T. theileri* y en 1 se evidencia una similitud cercana con *T. godfreyi* con un 91% de identidad.
- El análisis filogenético evidencia la presencia de distintos grupos de cepas del protozoario circulantes en Ecuador.
- Primer reporte que evidencia la presencia de *T. theileri* en Ecuador

## 7.2. RECOMENDACIONES

- Usar cebadores específicos para los tripanosomas una vez que estos sean identificados por Nested PCR.
- Evaluar continuamente la presencia de tripanosomas en Ecuador, a pesar de que no sean evidentes los síntomas, para evitar la disipación de la enfermedad.
- Realizar en Ecuador estudios epidemiológicos que permitan determinar la situación de tripanosomosis bovina en zonas de la costa y oriente.
- Caracterizar taxonómicamente a CMQ 73

**BIBLIOGRAFIA**

- Batista J., Riet-Correa F., Teixeira M., Madruga C., Simões S. & Maia T. (2007) Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary parasitology* 143, 174-81.
- Borst P., Fase-Fowler F. & Gibson W.C. (1987) Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Molecular and biochemical parasitology* 23, 31-8.
- Bose R., Riedhoff, Karl & Olbrich S. (1987) Transmission of *Megatrypanum trypanosomes* to *Cervus dama* by Tabanidae. *The Journal of protozoology* 34, 110-3.
- Braun U., Rogg E., Walser M., Nehrbass D., Guscetti F., Mathis A. & Deplazes P. (2002) *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. *Veterinary record* 150, 18-9.
- Clausen P.H., Wiemann A., Patzelt R., Kakaire D., Poetzsch C., Peregrine A. & Mehlitz D. (1998) Use of a PCR Assay for the Specific and Sensitive Detection of *Trypanosoma* Spp. in Naturally Infected Dairy Cattle in Peri-urban Kampala, Uganda. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849, 21-31.
- Cox A., Tilley A., McOdimba F., Fyfe J., Eisler M., Hide G. & Welburn S. (2005) A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental parasitology* 111, 24-9.
- Dávila A., Herrera H., Schlebinger T., Souza S. & Traub-Cseko Y. (2003) Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Veterinary parasitology* 117, 1-13.

- Davila A.M. & Silva R.A. (2000) Animal trypanosomiasis in South America: current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916, 199-212.
- Desquesnes M. (2004) *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. OIE (World Organisation for Animal Health).
- Desquesnes M. & Davila A. (2002) Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary parasitology* 109, 213-31.
- Desquesnes M., Holzmuller P., Lai D.-H., Dargantes A., Lun Z.-R. & Jittaplapong S. (2013) *Trypanosoma evansi* and *surra*: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International* 2013.
- Desquesnes M., McLaughlin G., Zoungrana A. & Dávila A.M. (2001) Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *International journal for parasitology* 31, 610-4.
- Garcia H.A., Kamyngkird K., Rodrigues A.C., Jittapalapong S., Teixeira M.M. & Desquesnes M. (2011a) High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Veterinary parasitology* 180, 363-7.
- Garcia H.A., Rodrigues A.C., Martinkovic F., Minervino A.H., Campaner M., Nunes V.L., Paiva F., Hamilton P.B. & Teixeira M.M. (2011b) Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *International journal for parasitology* 41, 1385-96.

- Geerts S. & Holmes P.H. (1998) Drug management and parasite resistance in bovine trypanosomiasis in Africa. *PAAT Technical and scientific series*.
- Geysen D., Delespaux V. & Geerts S. (2003) PCR–RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary parasitology* 110, 171-80.
- González A.R. (2016) Optimización de la técnica inmunoenzimática elisa para la detección de anticuerpos igg contra *Trypanosoma* sp. En el ganado bovino. pp. 48-65. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Gonzatti M.I., González-Baradat B., Aso P.M. & Reyna-Bello A. (2014) *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* and typanosomosis in Latin America: secadera/huequera/cacho hueco. In: *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261-85. Springer.
- Hoare C. (1972) *The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph* Blackwell. Oxford.
- Jaimes-Dueñez J., Triana-Chávez O. & Mejía-Jaramillo A.M. (2016) Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Ticks and Tick-borne Diseases*.
- Maudlin I., Holmes P.H. & Miles M.A. (2004) *The trypanosomiases*. CABI.
- McLaughlin G., Ssenyonga S., Nanteza E., Rubaire-Akiki W.O., Hansen R., Vodkin M., Novak R., Gordon V., Montenegro-James S. & James M. (1996) PCR-based detection and typing of parasites. *Parasitology for the 20th century*, 261-87.

- McNamara J., Mohammed G. & Gibson W. (1994) *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: biological and biochemical characterization. *Parasitology* 109, 497-509.
- McPherson M. & Møller S. (2007) *Pcr*. Garland Science.
- Meléndez R.D., Forlano M. & Figueroa W. (1993) Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. *The Journal of parasitology* 79, 293-4.
- Myler P.J. (1993) Molecular variation in trypanosomes. *Acta tropica* 53, 205-25.
- Nakayima J., Nakao R., Alhassan A., Hayashida K., Namangala B., Mahama C., Afakye K. & Sugimoto C. (2013) Genetic diversity among *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. *Parasite* 20.
- Ohkanda J., Buckner F.S., Lockman J.W., Yokoyama K., Carrico D., Eastman R., de Luca-Fradley K., Davies W., Croft S.L. & Van Voorhis W.C. (2004) Design and synthesis of peptidomimetic protein farnesyltransferase inhibitors as anti-*Trypanosoma brucei* agents. *Journal of medicinal chemistry* 47, 432-45.
- OIE (2015) Organización Mundial de Sanidad Animal.
- Ortega (2014) Diseño y Optimización de un protocolo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación molecular de *Trypanosoma vivax* en el ganado bovino. . *Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE*.
- Osório A.L.A.R., Madruga C.R., Desquesnes M., Soares C.O., Ribeiro L.R.R. & Costa S.C.G.d. (2008) *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World-a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 1-13.

- Payne R., Sukanto I., Bazeley K. & Jones T. (1993) The effect of *Trypanosoma evansi* infection on the oestrous cycle of Friesian Holstein heifers. *Veterinary parasitology* 51, 1-11.
- Pollard V.W., Rohrer S.P., Michelotti E.F., Hancock K. & Hajduk S.L. (1990) Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. *Cell* 63, 783-90.
- Ramírez Iglesias J., Eleizalde M., Reyna Bello A. & Mendoza M. (2016) Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *Journal of Parasitic Diseases*, 1-9.
- Rodrigues A., Campaner M., Takata C., Dell'Porto A., Milder R., Takeda G. & Teixeira M. (2003) Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Veterinary parasitology* 116, 185-207.
- Rodrigues A., Paiva F., Campaner M., Stevens J., Noyes H. & Teixeira M. (2006) Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 132, 215-24.
- Sanger F. & Coulson A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology* 94, 441-8.
- Shaw J. & Lainson R. (1972) *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 66, 25-32.
- Soulsby E. (1987) *Parasitología y enfermedades parasitarias*. México.
- Van Vlaenderen G. (1996) In search of cattle trypanosomiasis in Suriname. *Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, Master of Science Thesis*.

- Virviescas F. (1932) La lucha contra la tripanosomiasis bovina en la Costa Atlantica. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia* 4, 315-26.
- Ward W., Hill M., Mazlin I. & Foster C. (1984) Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. *Australian veterinary journal* 61, 324-.
- Wells E., Betancourt A. & Ramirez L. (1977) The epidemiology of *Trypanosoma vivax* in Latin America: some results from the use of an indirect fluorescent antibody test. *Journal of Protozoology* 24, 41A-2A.
- Woo P. (1970) The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica* 27, 384-6.

