

Estudio parasitológico y entomológico de tripanosomiasis en bovinos (*Bos Taurus*) raza Holstein de una hacienda de zona ganadera lechera de clima frio. Antioquia, Colombia.

Parasitological and entomological study of trypanosomiasis in (*Bos taurus*) Holstein dairy cattle in a farm under cold weather conditions in Antioquia, Colombia.

**Richard Zapata Salas¹ Microb, MSc (c); Leonardo Alberto Ríos Osorio² Bact, PhD;
Rolando Barahona Rosales³ Bsc, MSc, PhD; Diana Polanco Echeverry⁴ Bact, MSc, Est PhD.**

¹Candidato a Magíster en Microbiología y Bioanálisis, línea de Microbiología Veterinaria, Profesor, Escuela de Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Universidad de Antioquia.

²Cotutor, Profesor Escuela de Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Universidad de Antioquia.

³Cotutor, Profesor Departamento de producción animal. Universidad Nacional.

⁴Tutora, Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria, Universidad de Antioquia.

Resumen

La tripanosomiasis bovina americana es una enfermedad hemoparasitaria compleja y de comportamiento epizootico impredecible que afecta principalmente los sistemas bovinos de producción de carne dado que las zonas geográficas donde se desarrollan estos sistemas productivos permiten la coexistencia de vectores, parásitos y hospederos. Dado que en Entrerriós, zona ganadera dedicada a los sistemas bovinos especializados en producción láctea, se presentó en agosto de 2010 un caso clínico por *Trypanosoma* sp. el cual fue confirmado por técnicas de microscopía, se propuso realizar un estudio parasitológico y entomológico de tripanosomiasis en bovinos de producción lechera de clima frio. Se realizaron técnicas parasitológicas directas por microscopía y PCR con dos marcadores moleculares que diferencian los tripanosomas hasta especie en muestras de sangre de bovinos y partes de moscas. Se encontró una frecuencia de infección por *Trypanosoma vivax* en bovinos de 3.6%; no se identificaron bovinos

positivos para *Trypanosoma evansi*. No hubo relación estadística ($p > 0.05$) entre las variables fisiológicas, clínicas y de producción, y la infección por *T. vivax*. La caracterización de vectores muestra a *Haematobia irritans* con un 97.1% como la mosca más frecuente en la zona de estudio, seguido de *Stomoxys calcitrans* (2.8%). No se identificaron tabanidos, lo que representa un comportamiento epizootico atípico al que sucede en países de Sur América, ya que al identificar los parásitos en probóscide y toráx-abdomen de las moscas picadoras y por su alta densidad poblacional, se validó como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* la mosca de los cuernos. Por medio de un modelo de regresión lineal múltiple se encontró una relación estadísticamente significativa entre el número de animales positivos y el número de moscas capturadas ($p = 0.034$), el modelo indica que por cada mosca de la especie *Haematobia irritans* más en la hacienda, habrá un incremento de 0.002 animales positivos para *T. vivax*, es decir, por cada incremento de 500 moscas *Haematobia irritans* en la zona de estudio se infectará con *T. vivax* un nuevo bovino.

Palabras clave: *bovinos de producción lechera, Haematobia irritans, PCR, Stomoxys calcitrans, Trypanosoma evansi, Trypanosoma vivax.*

Abstract

American bovine trypanosomiasis is a complex haemoparasitary disease of unpredictable epizootic behavior that mainly affects the beef cattle production systems as the geographical areas where these productive systems exist allow for the coexistence of vectors, parasites and hosts for this disease. In August, 2010, in Entreríos, a highland, temperate weather area where agricultural production almost exclusively consists of specialized dairy cattle farms, a clinical case of *Trypanosoma* sp. was reported and later confirmed by the use of microscopy techniques. In consequence, we decided to undertake a parasitological and entomological study of trypanosomiasis in temperate weather dairy farms. To do this, both direct parasitological

determinations by microscopy and PCR analyses using two different molecular markers which allows identifying different species of trypanosomes in blood samples from cattle and parts of flies, were performed. The frequency of infection with *Trypanosoma vivax* in cattle of 3.6% and no cattle positive for *Trypanosoma evansi* were found. There was no a significant relationship ($p > 0.05$) between physiological, clinical and production variables and infection with *T. vivax*. The characterization of *Haematobia irritans* vectors showed flies as the most frequent vector (97.1%) followed by *Stomoxys calcitrans* (2.8%). Horseflies were not identified, which constitutes an atypical epizootic behavior different to what occurs in South American countries, and because parasites were identified in proboscis and thorax-abdomen of biting flies and due to their high population density, the horn fly was established as the main vector for *T. vivax* and *T. evansi*. Using a multiple linear regression model a significant ($p = 0.034$) relationship between the number of positive animals and the number of flies caught was found. The model indicates that for each additional *Haematobia irritans* fly on the farm, will be an increment of 0.002 animals positive for *T. vivax*, ie for each increment of 500 *Haematobia irritans* flies in the study area, there will be a new bovine infected with *T. vivax*.

Keywords: Dairy cattle, *Haematobia irritans*, PCR, *Stomoxys calcitrans*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*.

Introducción

La tripanosomiasis bovina es una enfermedad hemoparasitaria de distribución mundial (Desquesnes, 2004), ocasionada en países de América Latina por protozoos flagelados de las especies *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*, mediante transmisión mecánica por moscas hematófagas (Osório *et al.*, 2008). En Sur América la dispersión de los parásitos en la población bovina se ha atribuido principalmente a las “moscas de los equinos” familia Tabanidae: *Tabanus*, *Chrysops* y *Cryptotylus* y a la “mosca de los

establos" *Stomoxys calcitrans* (Osório *et al.*, 2008). Sin embargo, también se ha reportado la transmisión de *T. vivax* y *T. evansi* por la "mosca de los cuernos" *Haematobia irritans*, el murciélago vampiro *Desmodus rotundus* (Desquesnes, 2004, Herrera *et al.*, 2004, Zapata *et al.*, 2009; Parra-Henao *et al.*, 2008) y la transmisión iatrogénica ocasionada por prácticas veterinarias y manejo animal inadecuado (Dávila *et al.*, 2000).

En áreas donde la transmisión es estrictamente mecánica, la tripanosomiasis bovina ocurre en forma de brotes epizooticos múltiples periódicos, en un contexto enzoótico subclínico (Osório *et al.*, 2008). Esta condición epidemiológica hace que sea difícil la detección en el torrente sanguíneo, debido a las bajas parasitemias, producto del control inmunitario y los tratamientos suministrados (Osório *et al.*, 2008). No obstante, en períodos enzoóticos clínicos los bovinos evidencian fiebre y anemia severa con ictericia al momento del examen clínico. Se ha concluido que las complicaciones que llevan a la muerte de bovinos infectados con *T. vivax* están explicadas por combinaciones de alteraciones microcirculatorias, daños cardiacos y anemia (Vargas *et al.*, 1997; Zapata *et al.*, 2009). Bovinos infectados con *T. evansi* manifiestan compromiso clínico severo a través de un cuadro nervioso, caracterizado por cojera, temores, parestesias y convulsiones en los casos más severos, cuadro clínico que ha sido ya reportado en infecciones por *T. vivax* (Batista *et al.*, 2007).

Estas alteraciones en el estado de salud generan un impacto económico en el sistema productivo, como resultado principalmente de abortos, descenso en la producción láctea, pérdida de peso y mala calidad del semen (Batista *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009). Impacto que suele ser intermitente y durante un período largo de tiempo, gracias a la habilidad del parásito para persistir en el mamífero dada su capacidad para evadir la respuesta inmune del hospedador, sintetizando glicoproteínas variantes de superficie que forman una capa densa en la superficie celular para proteger los antígenos no variantes de superficie del reconocimiento inmunológico, estos antígenos cambian aleatoriamente en períodos cortos de tiempo (Morrison *et al.*, 2009) obstaculizando una respuesta

inmunológica protectora y duradera. Aunado a este fenómeno inmunológico, la limitada transmisión por vectores no constante en el tiempo, explicada por la transmisión mecánica, desencadena una infección con períodos clínicos intermitentes. En el modelo de tendencia de prevalencia parasitológica de *T. vivax* y prevalencia serológica en bovinos expuestos a vectores mecánicos, los 30 primeros meses posinfección corresponden a un período epizoótico con parasitemias detectables e intermitentes con un pico de prevalencia serológica cerca del mes 10, período en el cual se presentan fases clínicas de la infección, luego entre los meses 30 y 63 ocurre un período interepizoótico subclínico caracterizado por parasitemias indetectables y un descenso gradual en la inmunidad, siendo aproximadamente de los 63 meses posinfección en adelante un período epizoótico similar al primero, en el que la prevalencia parasitológica puede incrementarse de forma impredecible con presentación de casos clínicos (Osorio *et al.*, 2008).

En Colombia según la encuesta nacional agropecuaria del 2002, la ganadería bovina estaba conformada por 24.7 millones de bovinos de los cuales el 57% se dedica a la producción de carne, el 39% al doble propósito y el 4% está constituido por bovinos de sistemas especializados en producción de leche (FINAGRO, 2008) ubicados en zonas geográficas de clima frío. La enfermedad causada por *Trypanosoma* sp. ha sido reportada en búfalos y bovinos de diferentes zonas del territorio colombiano (Zapata *et al.*, 2009; Wells *et al.*, 1982), donde regiones tropicales y subtropicales establecen los ecosistemas con las características óptimas para que reservorios, el hemoparásito y los vectores cohabiten (García *et al.*, 2011). *T. vivax* es enzoótico en todo el país en alturas por debajo de los 1000 msnm (Desquesnes, 2004), con condiciones ecológicas que difieren de las zonas donde se desarrollan los sistemas especializados en producción de leche en el país. Estudios serológicos han identificado animales serorreactivos a *T. vivax* en Córdoba, Sucre, Valle del Cauca, Boyacá y Meta; con valores de serorreactividad entre 1.4% y 48% (Wells *et al.*, 1982). Resultados similares han sido publicados por la OIE, quien refiere a Colombia como un país que presenta inestabilidad enzoótica y epizoótica a la infección por *T. vivax*.

En Colombia, ningún estudio sobre la prevalencia o impacto económico de *T. evansi* ha sido realizado sobre rumiantes domésticos (Desquesnes, 2004).

Entrerríos, es un municipio del norte del departamento de Antioquia (Colombia) que tiene como principal actividad económica la producción y reproducción de ganado especializado en producción de leche, se encuentra ubicado en las coordenadas geográficas: 6°37'03.67" N 75°30'58.12"O a 2486 msnm, clasificado como zona de vida bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB), y se caracteriza por su clima frío con una temperatura promedio de 16 °C (mínima 9 °C – máxima 24 °C), condiciones no habituales para la presentación de esta entidad parasitaria. En esta zona ganadera no se han realizado estudios sobre la epizootiología de la tripanosomiasis bovina. Sin embargo, en agosto de 2010 se evaluó un caso clínico compatible con una hemoparasitosis, confirmado por técnicas de microscopía (extendido de sangre periférica ESP y el método Buffy coat) como infección por *Trypanosoma* sp. en una vaca productora de leche nacida en una hacienda de la zona. A partir de este caso, se propuso realizar un estudio parasitológico y entomológico de tripanosomiasis en bovinos de producción lechera de clima frío en esta hacienda.

Materiales y métodos

Población bovina del estudio

Las muestras fueron tomadas entre noviembre de 2010 y febrero de 2011, en una hacienda ganadera de producción láctea ubicada en el municipio de Entrerríos, Antioquia. Entrerríos se encuentra ubicado en la subregión norte del departamento de Antioquia, presenta una extensión de 219 kms², una temperatura media de 16 °C y una altura a la cabecera municipal de 2300 msnm (<http://www.enterrerios-antioquia.gov.co/index.shtml>).

Se diseñó un estudio de tipo descriptivo transversal. El universo muestral fue de 1296 bovinos entre 1 y 169 meses de edad pertenecientes a una hacienda dedicada a la producción láctea, con un promedio en producción de 16.000 litros/día. Esta hacienda

está conformada por 7 salas de ordeño con 420 potreros en un área de 768 hectáreas (cada sala contiene hembras distribuidas en lotes de alta, media y baja producción, horro y paridero); lotes de novillas de vientre, novillas de levante, novillas preñadas y balde estaca (cría) (ver tabla 1). Se realizó un muestreo no probabilístico. Se utilizó el programa Epi-info versión 6 para calcular el tamaño muestral, tomando un nivel de confianza ($z=95\%$), un error de muestreo ($e=3\%$) y una probabilidad de ocurrencia del fenómeno ($P=0,07$) acorde con los resultados de prevalencia obtenidos en un estudio sobre *Trypanosoma vivax* en ganado bovino productor de leche en el estado Minas Gerais, Brasil que presenta condiciones climáticas similares.

Se definió un tamaño muestral de 229, y se llevó a 338 bovinos previendo pérdidas en la muestra y para aumentar el poder estadístico. (Ver tabla 1).

Tabla 1. Universo muestral y proporción de los estratos de la muestra

Ubicación	Universo muestral					Muestra					%	
	Producción	Horro	Paridero	Otro	Total	Producción	Horro	Paridero	Otro	Total		
Sala 1	116	19	17		152	31	5			36	10,6	
Sala 2	120	11	10		141	43	3	3		49	14,5	
Sala 3	112	29	20		161	45	5			50	14,8	
Sala 4	117	26	11		154	29	6			35	10,4	
Sala 5	71	14	4		89	20	3			23	6,8	
Sala 6	71	13	9		93	17	3	3		23	6,8	
Sala 7	37	6	3		46	1	4	4		9	2,7	
Novilla Vientre					72					31	31	9,2
Novilla Levante					286					52	52	15,4
Novilla Preñada					27					11	11	3,2
Balde estaca					75					19	19	5,6
Totales	644	118	74	460	1296	186	29	10	113	338	100	

Identificación de reservorios

Se evaluó el 50% de los caballos de la hacienda ($n=17$) y el 10% de bovinos de producción de carne ($n=11$), de una hacienda aledaña que tienen como característica ser provenientes de diferentes regiones del país, sin ningún control o evaluación para la infección por *Trypanosoma* sp. previo a su introducción a la zona lechera del norte de Antioquia. Estos

animales se valoraron por las mismas técnicas implementadas para la ganadería de producción lechera.

Colección y conservación de muestras sanguíneas

Se obtuvo una muestra de sangre de cada bovino tomada de vena coccígea o vena yugular; recolectada en tubos al vacío vacutainer estériles de 4 ml con anticoagulante EDTA y agujas calibre 21. Previo al procedimiento fueron marcados los tubos con el código del animal y la ubicación en la hacienda. Las muestras fueron conservadas en refrigeración a 4 °C hasta el momento del procesamiento de las técnicas de microscopía. Para la identificación de especie a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se tomaron 200 µl de sangre que fueron conservados en alícuotas a -20 °C.

Diagnóstico por técnicas de microscopía

Se realizaron extendidos de sangre periférica utilizando la coloración Hemacolor (Merck®). Posterior al secado del frotis al ambiente, se realizó la inmersión de los frotis en cada solución de la coloración. El tiempo en la solución 1 (fijado) fue de 1 segundo (1 dip), 6 segundos en la solución 2, 4 segundos en la solución 3 y 40 segundos de lavado en el buffer.

Como técnica de concentración por microscopía se realizó el método Buffy coat descrito por Betancourt and Julio, 1979; la cual fue modificada de la siguiente manera. A partir de la muestra obtenida en el tubo con EDTA se procedió al llenado de $\frac{3}{4}$ partes de un tubo capilar sin heparina. Este se centrifugó a 8.000 rpm durante 5 minutos, el cual permitió hacer inicialmente la lectura del hematocrito, luego con lapicero de punta de diamante se partió el tubo capilar en la zona en la que se separan los leucocitos de los eritrocitos (capa de blancos) y se realizó el extendido de una gota de plasma, la cual se dejó secar al aire. Para la observación de los parásitos se utilizó la coloración Hemacolor (Merck®) con los mismos tiempos designados para los ESP, pero a diferencia de esta, después del fijado

debían transcurrir 12 horas para poder exponer el frotis a las soluciones 2 y 3 y lavado con buffer (permitiendo así la apropiada fijación del extendido de plasma a la placa).

La lectura de los ESP y el método Buffy coat se realizaron en microscopio óptico Nikon Eclipse E-200, con objetivo de 100x. El diagnóstico parasitológico positivo para *Trypanosoma sp.* se definió como la detección de organismos flagelados en los cuales se identificara la presencia de membrana ondulante, núcleo y kinetoplasto; se consideró positiva aquella muestra en la cual fuera detectada al menos una forma parasitaria concordante con *Trypanosoma sp.* en una de las dos pruebas parasitológicas realizadas. Con estas características morfológicas se llegó a la identificación de género. Adicionalmente, para la evaluación del ESP se realizó el cálculo de parasitemia con base en la fórmula:

$$\text{Parasitemia} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de leucocitos}/\mu\text{l} \times \text{N}^{\circ} \text{ Trypanosoma sp. contados en 100 leucocitos}}{100 \text{ leucocitos}}$$

Extracción de ADN de sangre de bovinos

Se utilizó la técnica *Salting out* estandarizada por el Grupo de investigación Biología y control de enfermedades infecciosas. En esta técnica se realizan a una muestra de sangre de 200 μl un lavado con buffer de lisis 1 (5000 rpm x 10 minutos) y dos lavados con buffer de lisis 2 (7000 rpm x 5 minutos). Luego, al sobrenadante se le agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío y se llevó a -20°C por 1 hora. Posteriormente, el centrifugado (3000 rpm x 20 minutos) se lavó con etanol al 70% frío (13000 rpm x 10 minutos). Luego del secado el etanol (5 minutos a 37°C) el ADN se resuspendió en buffer TE. El ADN se disolvió por incubación a 65°C por 20 minutos. La concentración del ADN (ng/ μl) y la relación ADN/proteína (260/280 nm) fue estimada utilizando 2 μl del ADN extraído en un NanoDrop 2000c.

Primers y pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Fueron utilizados *primers* para la caracterización de especie. Para la identificación de *T. vivax* se empleó el set de *primers* ILO1264, 5'-CAG CTC GCC GAA GGC CAC TTG GCT GGG-3' e ILO1265, 5'-TCG CTA CCA CAG TCG CAA TCG TCG TCT CAA GG-3', que amplifica un fragmento de gen de 400 pb (Masake, et al. 1997). Para la caracterización de *T. vivax* y *T. evansi* en una sola reacción, se utilizaron los *primers* ITS1 F, 5'CCG GAA GTT CAC CGA TAT TG 3' e ITS1 R, 5'TGC TGC GTT CTT CAA CGA A 3', empleados ampliamente para la caracterización de *T. vivax*, *T. evansi* y otras especies patógenas aún no reportadas en bovinos en Colombia, como son *T. brucei* y *T. congolense*. Este marcador amplifica un fragmento de 480 pb para *T. evansi* y un fragmento de 250 pb para *T. vivax*, y fue diseñado por Dávila, inédito (Gonzales, et al., 2006).

La PCR para *T. vivax* empleando el marcador ILO 1264, 1265 tuvo un volumen de reacción (mix) de 20 µl, que contiene 2 µl de buffer 10X, 1.2 µl MgCl₂ a 1.5 mM, 2 µl dNTPs a 2 mM, 1 µl de primer a 10 pmol (cada uno), 0.2 µl de Taq ADN polimerasa a 1U/µl y 1 µl de ADN de la muestra (la concentración de ADN promedio en las muestras de animales fue 25 ng/µl, la concentración de ADN promedio en las muestras compuestas de moscas fue 48 ng/µl), la relación ADN/proteína estuvo entre 1.8 y 2.2. Se utilizó un termociclador Biometra modelo T gradient. El programa implementado consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineamiento y extensión a 68 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 7 minutos.

La PCR con el marcador ITS1 tuvo un volumen de reacción (mix) de 25 µl, con 2.5 µl de buffer 10X, 1.5 µl MgCl₂ a 1.5 mM, 2 µl dNTPs a 2 mM, 2 µl primer a 10 pmol (cada uno), 0.125 µl de Taq ADN polimerasa y 5 µl de ADN de la muestra (la concentración de ADN promedio en las muestras de animales fue 25 ng/µl, la concentración de ADN promedio en las muestras de moscas fue 48 ng/µl). Se programó la PCR con una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 minutos, 38 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos,

alineamiento 56 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 90 segundos y una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de amplificación para ambas PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% (45 minutos a 100 V). Para visualizar las bandas se usó bromuro de etidio al 5% y un transiluminador BIO-RAD, modelo XRS.

Controles positivos de ADN de *Trypanosoma*

Los controles positivos de ADN de *T. vivax*, *T. evansi* y *T. theileri* fueron donados por el banco de germoplasma de microorganismos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). El control de *T. cruzi* fue cedido por el grupo de investigación Biología y control de enfermedades infecciosas, de la Universidad de Antioquia. Los controles de *T. theileri* y *T. cruzi* se utilizaron para validar la especificidad de los marcadores moleculares. Como control negativo se utilizó la mezcla para la PCR sin ADN.

Población muestral de vectores

Se capturaron 4251 moscas distribuidas en 16 lotes de vacas de las diferentes salas de ordeño. Utilizando una jama se capturaron moscas posadas sobre las zonas dorsal, ventral y patas de bovinos por un período aproximado de una hora en cada lote. Se almacenaron en bolsas plásticas y luego fueron conservadas en tubos de ensayo con alcohol al 70% para su posterior identificación taxonómica e identificación de especies de parásitos del género *Trypanosoma* a través de pruebas moleculares.

Diagnóstico entomológico

La identificación de las moscas se efectuó con base en las claves taxonómicas descritas por Harry y Stojanovich 1969; Soulsby, 1987; Quintero, 1991, que comparan tamaños de mosca; tamaño, forma y posición de probóscide; bandas dorsales y laterales; disposición

de las venas de las alas; morfología de palpos; color de tórax y rostro y morfología de la arista antenal.

Extracción de ADN desde moscas

La extracción de ADN se realizó para 56 muestras. Se realizó una disección de la cabeza de las moscas con el fin de obtener el ADN del parásito que se encontrara en la probóscide de la mosca. Se conformaron muestras compuestas de cabezas de *Haematobia irritans* (al ser esta la mayor población de potenciales vectores, 100 cabezas de *H. irritans* de cada lote de bovinos donde fueron capturadas, se depositaron en viales para extracción), las muestras compuestas de cabeza de *Stomoxys calcitrans* se conformaron con el total de moscas encontradas en cada lote de bovinos donde fueron capturadas (número no mayor a 100 individuos). Con el fin de encontrar el parásito en intestinos de los potenciales vectores se hicieron muestras compuestas de tórax-abdomen de las moscas evaluadas. La extracción de ADN desde la *Musca domestica* se realizó con el ejemplar completo.

El ADN a partir de moscas se obtuvo con la técnica de extracción de *DNA Grind buffer* propuesta por Collins *et al.*, 1987; estandarizada por el Grupo de Investigación Biología y control de enfermedades infecciosas para la obtención de ADN desde triatomíneos y adaptada en el presente estudio para la extracción de ADN a partir de moscas. Se maceró el contenido de las muestras en 100 µl de *Grind buffer* a 65 °C, después de agregar 50 µl más de *Grind buffer* se incubó a 65 °C por 20 minutos. Luego, se agregaron 18 µl de acetato de potasio 8 M y se llevó a -20 °C por 30 minutos. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante se depositó en otro vial. Así, se realizaron 3 lavados con etanol al 100, 70 y 100% respectivamente sometiendo a centrifugación a 13000 rpm por 20, 5 y 5 minutos respectivamente. Luego de descartar el etanol se dejó secar cada vial a 37 °C por 5 minutos y se agregaron 50 µl de agua ultra pura.

Encuesta clínico-epizootiológica

Se diseñó una encuesta como instrumento para la obtención y organización de información de la población evaluada. Se evaluaron variables de tipo fisiológico, clínicas, de producción y de manejo animal; como la raza, la edad, el sexo, la proveniencia del bovino, la ubicación, el estado fisiológico, la producción de leche, los días de producción de leche y el estado de salud detectado por evaluación médico veterinaria.

Aspectos éticos

Se obtuvo la aprobación para la ejecución de la investigación, a través de un consentimiento informado leído y firmado por los representantes legales de la hacienda. Así mismo, en cumplimiento de las disposiciones expuestas en la resolución 008430 de 1993, el estudio fue evaluado y aprobado por el comité de ética en investigación animal en acta N°65 del 29 de septiembre de 2010. También se consideraron las indicaciones expresas en la ley 84 del 27 de diciembre de 1989, para garantizar las buenas prácticas en los procedimientos a realizar en los bovinos objeto de estudio y para garantizar su bienestar en todo el proceso.

Plan de análisis

Se realizó un análisis univariado de cada una de las variables cuantitativas y cualitativas, en las que se calculó la frecuencia absoluta y relativa para las variables cualitativas y los estadísticos descriptivos por cada variable cuantitativa. Se exploró la asociación entre las variables clínicas y de producción con la positividad, y se ajustó la positividad según la ubicación en los compartimentos de la hacienda, usando el Chi cuadrado de independencia y el cálculo del Odds Ratio (OR) con su respectivo intervalo de confianza. De otro lado se recodificaron las variables susceptibles a ser analizadas en dos estratos y se usaron en tablas de dos por dos para explorar su asociación epidemiológica. Se realizó un análisis de normalidad mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov para las variables de producción, clínicas y entomológicas. Adicionalmente, se exploró la aleatoriedad de las variables entomológicas y se validó el supuesto mediante la prueba de las rachas. Se

efectuó un análisis de diferencia entre las variables de producción y clínicas individuales y el estado de positividad en los bovinos positivos, usando la U de Mann Whitney. La relación entre la positividad para *Trypanosoma vivax* en bovinos y el número de moscas capturadas según su clasificación taxonómica se analizó mediante un modelo de regresión lineal múltiple. Dicho análisis se realizó con una agrupación resumen a nueve compartimentos (salas donde se capturaron moscas). Se validaron los supuestos del modelo de regresión, encontrándose satisfactorios. Un nivel de significancia de 0.05 fue utilizado en todas las pruebas. Los datos fueron analizados en el paquete estadístico SPSS versión 19.

Resultados

La población de bovinos de raza Holstein estudiados tuvo un promedio de edad de 4,4 años (desviación 3,0), con un promedio de producción de 22 litros de leche por día, y un promedio de 242 días en producción de leche. La población estudiada se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Elementos epizootiológicos de la población de estudio.

Variable	%	n
Edad (media \pm desviación)	4,4 \pm 3	
Menores de 30 meses	34	115
31 a 60 meses	18,9	64
mayores de 60 meses	47,1	159
Sexo		
Hembras	100	338
Raza		
Holstein	100	338
Lugar de nacimiento		
Hacienda (Entrerríos)	100	338
Estado fisiológico		

Producción	66,6	225
Novilla de vientre	9,2	31
Novilla de levante	15,4	52
Novilla preñada	3,2	11
Cría	5,6	19
Producción leche L/día		
Menos de 15 L	17,3	36
15.1 a 25 L	50,5	105
Mayor a 25 L	32,2	67

La frecuencia de positividad hallada mediante el uso de cuatro pruebas diagnósticas, dos pruebas parasitológicas directas por microscopía (Figuras 2-4) y PCR con dos marcadores utilizados para la identificación de especies (*T. vivax* y *T. evansi*) (Figuras 5 y 6), no evidenció animales positivos para *T. evansi*. Los porcentajes de positividad para *T. vivax* obtenidos por prueba se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Positividad general para *T. vivax* según prueba diagnóstica

Prueba	Bovinos positivos		IC 95%	
	<i>T. vivax</i>		LI	LS
	n	%		
ESP	1	0,3	0,007	1,637
Buffy coat	1	0,3	0,007	1,637
PCR ILO 1264,1265	12	3,6	1,43	5,671
PCR ITS1	1	0,3	0,007	1,637

ESP: extendido de sangre periférica

De los 17 equinos de la hacienda y 10 bovinos de una hacienda aledaña provenientes de diferentes partes del país; no se obtuvieron resultados positivos.

Con base en la distribución de los períodos epizoóticos de la tripanosomiasis según el tiempo posinfección reportados para el caso de países latinoamericanos se obtuvo que de los bovinos positivos el 50% se encuentra por encima de los 60 meses de edad (rango= 60

– 110.4 meses), el 41.7% corresponde a bovinos menores de 30 meses (rango= 14.4 – 25.2 meses) y tan solo el 8.3% está representado por un bovino entre los 31 y 60 meses (49.2 meses).

Todos los bovinos y équidos independiente de ser positivos o negativos presentaron un hematocrito dentro de los valores normales. Se obtuvo un promedio de hematocrito para los bovinos de 35%, y en los équidos un promedio de 38%.

Se realizó un análisis bivariado de asociación entre las variables productivas y de salud en los animales, no se encontró asociación entre cada una de las variables y la positividad para *T. vivax*. Como puede observarse, en cada uno de los análisis bivariados ejecutados después de transformar las variables cuantitativas de razón en dos categorías de acuerdo a los estadísticos de resumen, ni el OR ni el valor de p, presentaron asociación estadísticamente significativa en ninguno de los casos analizados (tabla 4).

Tabla 4. Relaciones bivariadas entre la positividad para *T. vivax* y variables productivas y de salud recodificadas.

Variable	OR	IC		Chi-cuadrado	p
		LI	LS		
Hto	0,706	0,219	2,269	0,347	0,556
Edad	1,002	0,311	3,224	0	0,997
DEL	0,828	0,257	2,662	0,101	0,751
Prod. L/día	1,223	0,38	3,933	0,002	0,965

Hto: hematocrito; DEL: días en producción de leche; Prod. L/día: Promedio de producción de leche diario en litros.

A través de una exploración con la U de Mann Withney no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las variables individuales y el estado de positividad, ver tabla 5.

Tabla 5. Estadísticos de contraste.

Estadístico	Hto	Prod. L/día	Edad	DEL
U de Mann-Whitney	1806	1935	1750,5	1853
W de Wilcoxon	1884	2013	1828,5	51939
Z	-0,436	-0,028	-0,602	-0,14
Sig. asintót. (bilateral)	0,663	0,977	0,547	0,889

Hto: hematocrito; Prod. L/día: Promedio de producción de leche diario en litros y DEL: días en producción de leche.

Mediante un análisis de la proporción de positividad por cada compartimento del sistema de producción, se halló un mayor número de individuos positivos en la sala de ordeño 2 (25%), ver Figura 1.

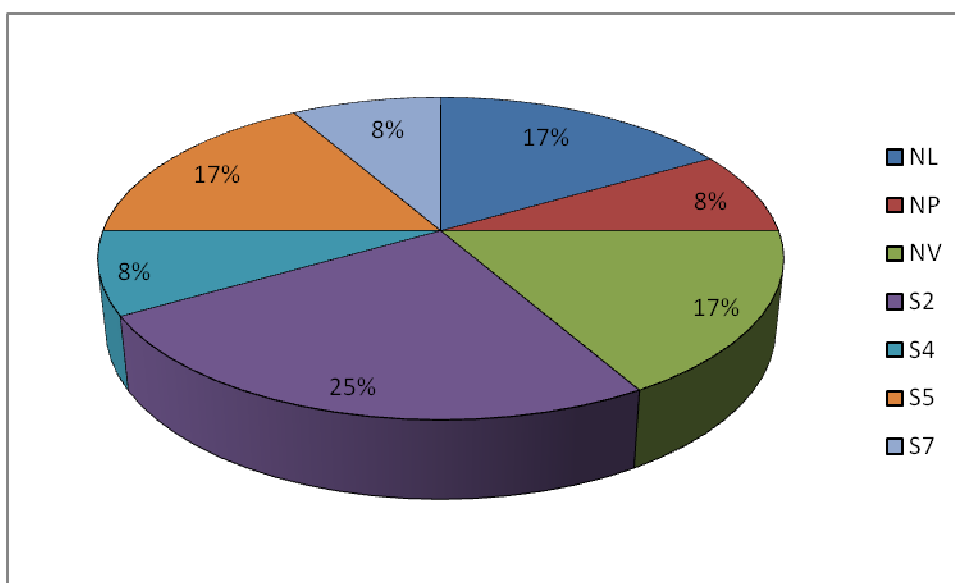


Figura 1. Proporción de positividad por compartimento del sistema productivo

NL: novilla de levante, NP: novilla preñada, NV: novilla de vientre, S2: sala 2, S4: sala 4, S5: sala 5 y S7: sala 7.

Hallazgos entomológicos

Se capturaron un total de 4251 moscas distribuidas en 16 lotes del sistema productivo. Las moscas capturadas corresponden a las especies *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* y *Musca domestica* con un 97.1%, 2.8% y 0.1% respectivamente del total evaluado. No se encontraron especies de moscas de la familia Tabanidae. La distribución de las moscas por especie según lote se describe en la tabla 6.

TABLA 6. Distribución de moscas hematófagas capturadas por lote de bovinos del sistema productivo.

LOTE	<i>Haematobia irritans</i>		<i>Stomoxys calcitrans</i>		<i>Musca domestica</i>		TOTAL
	n	%	n	%	n	%	
Sala 1 Producción	111	89,5	12	9,7	1	0,8	124
Sala 2 Paridero	375	99,2	3	0,8	0	0	378
Sala 2 Horro	661	99	6	1	0	0	667
Sala 3 Lote 1	0	0	16	94,1	1	5,9	17
Sala 3 Horro	278	99,6	1	0,4	0	0	279
Sala 4 Lote 2	245	99,6	1	0,4	0	0	246
Sala 5 Lote 1	8	100	0	0	0	0	8
Sala 5 Lote 2	504	97,9	10	1,9	1	0,2	515
Sala 5 Lote 3	72	98,6	1	1,4	0	0	73
Sala 6 Lote 1	181	100	0	0	0	0	181
Sala 6 Lote 2	582	99,1	4	0,7	1	0,2	587
Sala 6 Lote 3	320	97,6	8	2,4	0	0	328
Sala 6 Paridero	180	77,6	52	22,4	0	0	232
Novilla de vientre	251	99,6	0	0,4	1	0	252
Novilla de levante	13	76,5	3	17,6	1	5,9	17
Novilla preñada	347	100	0	0	0	0	347
TOTAL	4128	97,1	117	2,8	6	0,1	4251

De los lotes evaluados por entomología el 6.25% presentan moscas infectadas con *T. vivax* (sala 2 paridero) y el mismo valor se obtuvo (6.25%) para las moscas infectadas con *T. evansi* (sala 3 horro). *T. vivax* fue identificado en probóscide de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*) y en probóscide y tórax-abdomen de la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) (Figura 6). En los lotes con presencia de moscas infectadas con *T. evansi* se encontró el parásito tanto en probóscide como en tórax-abdomen de ambas especies de moscas picadoras (Figura 6). En el caso de la mosca común *Musca domestica*

no se encontraron especímenes infectados. Todos los resultados logrados en la caracterización de especies del parásito en moscas se obtuvieron con el marcador ITS1; las muestras positivas para *T. vivax*, no arrojaron igual resultado con el marcador ILO 1264, 1265.

Por análisis de regresión lineal múltiple se encontró una relación estadísticamente significativa (ANOVA $p= 0.034$) para las variables del modelo, es decir, entre el número de vacas positivas por cada compartimento de la hacienda y el número de moscas capturadas. Se validaron los supuestos del modelo de regresión, encontrándose satisfactorios. Las variables dentro del modelo que tuvieron significancia estadística fueron la mosca *Haematobia irritans* ($p= 0.032$) y la mosca *Stomoxys calcitrans* ($p= 0.013$) ver tabla 7.

Tabla 7. Modelo de regresión lineal múltiple de las variables entomológicas relacionadas con la positividad en bovinos para *Trypanosoma vivax*.

	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	p	IC 95% para B	
	B	Error típ.	Beta			LI	LS
(Constante)	0,946	0,369		2,56	0,043	0,042	1,849
<i>Haematobia irritans</i>	0,002	0,001	0,941	2,79	0,032	0,000	0,005
<i>Stomoxys calcitrans</i>	-0,064	0,018	-1,175	-3,48	0,013	-0,109	-0,019

Modelo obtenido:

$$\text{Bovinos positivos (} T. vivax \text{)} = 0.946 + 0.002 H. irritans + (-0.064) S. calcitrans$$

De acuerdo con las condiciones evaluadas, el modelo indica que por cada mosca de la especie *Haematobia irritans* más en la hacienda, habrá un incremento de 0,002 animales positivos para *T. vivax*, es decir, por cada incremento de 500 moscas *Haematobia irritans* en la zona de estudio se infectará un bovino más con *T. vivax*. De otro lado se observó una

relación inversa entre el número de moscas *Stomoxys calcitrans* y el número de animales positivos.

Discusión

En este estudio se encontró una prevalencia de infección por *T. vivax* en bovinos del 3.6%, la infección por *T. evansi* en bovinos no fue detectada por ninguna de las técnicas utilizadas. Estos resultados son comparables con algunos de los resultados obtenidos en otros estudios hechos en diferentes zonas del país. En Colombia, los primeros estudios que alertaron sobre la presencia de *T. vivax* fueron realizados en 1931 (Jones y Dávila, 2001), y solo hasta la década de los 60 comenzaron a estudiarse la producción de anticuerpos contra *T. vivax* en bovinos de diferentes zonas geográficas. Entre 1968 y 1970 Wells (1982) presenta resultados obtenidos por Platt (1974) en su tesis de maestría, donde se identificaron por inmunofluorescencia indirecta animales serorreactivos a *T. vivax* en Córdoba, Sucre, Valle del Cauca, Boyacá y Meta; con valores de serorreactividad entre 1.4% y 48%, de los cuales resultaron positivos por la técnica de ESP Córdoba (0.5%), Boyacá (5.3%) y Meta (14.9%), tan solo en una de tres valoraciones hechas en tres épocas del año o entre diferentes años. También se presentan los resultados de la tesis doctoral de Betancourt, quien evaluó entre 1972 y 1977 niveles de anticuerpos de rebaños de bovinos con inmunofluorescencia indirecta en los departamentos de Atlántico, Antioquia, Bolívar, Córdoba, Magdalena, Cauca, Valle, Caldas, Cundinamarca, Caquetá, Meta y Vichada, obteniendo valores de serorreactividad que oscilaron entre 13.5% y 62.5%, sin embargo no encontraron infecciones activas diagnosticadas por ESP en los departamentos de Valle con cifras del 1.3%, 2.5%, 9.5% y 11.1% y Cauca con un 8.3% (Wells *et al.*, 1982).

T. vivax es un hemoprotozoario enzoótico en Colombia en alturas por debajo de los 1000 msnm (Mateus *et al.*, 1992); en regiones del país más altas el parásito se ha encontrado de forma esporádica, como brotes que se han relacionado con movimientos de ganadería desde zonas enzoóticas con poblaciones de insectos hematófagos, principalmente

tábanos que sobreviven un corto tiempo en estas regiones (Mateus y González, 1991) a causa de la temperatura; las larvas de tabanidos se desarrollan rápidamente en clima cálido y son inactivas en clima frío (Foil y Hogsette, 1994), lo que representa la interrupción en el ciclo de vida de la mosca. En este estudio todos los bovinos evaluados han nacido en la hacienda, por tanto se presenta éste como un caso atípico de infección por *Trypanosoma* con la posible adaptación del parásito para ser transmitido a través de potenciales vectores de la zona.

En el estudio no se identificaron episodios clínicos, no fueron evidenciados procesos de anemia y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.663$) entre los valores del hematocrito al comparar bovinos infectados y no infectados. Estos hallazgos difieren de los resultados obtenidos por Cuglovici *et al.*, 2010 en bovinos de producción de leche con infección activa diagnosticada por la técnica de microcentrifugación del hematocrito (siglas en inglés: MHCT) y PCR, en donde la anemia fue el signo clínico corroborado con las diferencias entre los valores del hematocrito, siendo menores para los bovinos infectados en comparación con los negativos. Este evento puede estar explicado por las bajas parasitemias, que son comunes en estados crónicos de la infección o también llamados períodos interepizoóticos subclínicos los cuales se caracterizan por una relación inversamente proporcional entre la prevalencia serológica y la prevalencia parasitológica, con valores de parasitemia que en ocasiones son indetectables (Osorio *et al.*, 2008). Estudios sobre la infección por *T. vivax* reportada en algunas zonas de Brasil refieren a esta especie como un agente no causante de enfermedad normalmente, con la capacidad de inducir una infección crónica y asintomática (Cuglovici *et al.*, 2010). No obstante en zonas enzoóticas para *T. vivax* se presentan en fase aguda signos clínicos fuertes como son fiebre intermitente, anemia, edema, aborto, disminución en la producción de leche, pérdida de peso, paresia posterior y niveles de mortalidad cercanos al 50%, sin embargo la intensidad de estos signos clínicos disminuye en los períodos interepizoóticos subsecuentes (Osorio *et al.*, 2008). Esta disminución en los aspectos clínicos está condicionada a su vez por otros elementos de la epizootiología de la

enfermedad, como son los tratamientos instaurados, épocas del año que afectan la población de vectores y el establecimiento de inmunidad protectora (Osorio *et al.*, 2008).

La inmunidad del hato es aún desconocida y la información obtenida en este estudio no es suficiente para definir la inestabilidad o estabilidad enzoótica de la tripanosomiasis bovina en la zona. Sin embargo, en zonas donde la transmisión de *T. vivax* es estrictamente mecánica, como es el caso de Latino América, la tripanosomiasis en bovinos se manifiesta en forma de brotes epizoóticos múltiples y periódicos, y debido a que la transmisión mecánica es impredecible y limitada, el comportamiento enzoótico es inestable (Osorio *et al.*, 2008). Estas condiciones hacen que en Entreríos sea aún más complejo un proceso de estabilidad enzoótica para la tripanosomiasis bovina, ya que esta depende de muchos factores como son: especie del vector, niveles de infestación por moscas, tasas de inoculación, tipo de transmisión (cíclica o mecánica), estado de salud de los bovinos, infección y desarrollo de anticuerpos y control de vectores (Batista *et al.*, 2007; Desquesnes, 2004). A pesar de que *T. vivax* sufre variación antigénica durante el curso de la infección, se ha encontrado que la diversidad antigénica de cepas de *T. vivax* en Sur América es más limitada que en África, lo que podría llevar a un proceso de estabilidad enzoótica caracterizado por altos niveles de anticuerpos, bajas parasitemias y pocos o ningún caso clínico (Jones y Dávila, 2001). Sin embargo, esta hipótesis contrasta con los modelos de tendencias en la prevalencia serológica y parasitológica en poblaciones de bovinos expuestos a vectores mecánicos y cíclicos, donde la transmisión por vectores cíclicos permite estabilidad en los niveles bajos de prevalencia parasitológica y una alta prevalencia serológica a diferencia del modelo de transmisión por vectores mecánicos, donde la transmisión es impredecible y los períodos epizoóticos son inestables (Osorio *et al.*, 2008).

En la hacienda no se practica el tratamiento para la tripanosomiasis con ningún medicamento, ya que esta es una enfermedad nueva en la región; por tanto es alto el riesgo de sufrir fases clínicas durante los períodos epizoóticos y aunque no se encontró

una relación estadísticamente significativa ($p= 0.977$) entre la producción de leche y la infección por *T. vivax* es necesario considerar que bovinos en 60 meses posinfección salen de un período interepizoótico y comienzan nuevamente un período epizoótico, el cual constituye una etapa con un potencial riesgo para la economía del sistema productivo debido a alteraciones en la producción y reproducción. En un brote de tripanosomiasis por *T. vivax* en ganado de producción de leche en Colombia el promedio de pérdidas económicas fue de 56.50 dólares por animal, a razón principalmente de muertes y descarte forzoso de animales adultos; reducción en la producción de leche, abortos, nacimientos de animales débiles y el incremento en gastos por drogas y servicios veterinarios (Betancourt and Wells, 1979). En la hacienda se encontró en bovinos Holstein una frecuencia de infección por *Anaplasma marginale* del 29.6%, presentando coinfección el 25% de los bovinos positivos para *Trypanosoma vivax*; a pesar de no haber encontrado signos clínicos en los bovinos, según la literatura, la coinfección con *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma vivax* en bovinos, limita la producción, porque, a pesar de que en zonas enzoóticas la parasitemia de *Anaplasma marginale* puede ser baja, la inmunosupresión originada por *T. vivax* propicia el desarrollo de anaplasmosis, que a su vez agrava los síntomas generados por la tripanosomiasis (Desquesnes, 2004). Esta inmunosupresión se atribuye a un mecanismo de leucofagocitosis regulado por la liberación de neuraminidasas por tripanosomas en la fase aguda de la infección (Esievo y Saror, 1983).

Varios estudios en Sur América han presentado como principales vectores de la tripanosomiasis en bovinos a moscas picadoras de los géneros *Chrysops*, *Tabanus* y *Lepiselaga*, pertenecientes a la familia Tabanidae y a la mosca de los cuernos *Stomoxys calcitrans* cuando la transmisión en una zona no es efectuada por *Glossina* sp. (Silva *et al.*, 2002; Dávila *et al.*, 2003; Parra-Henao *et al.*, 2008; Desquesnes, 2004). La mosca *Haematobia irritans* no es considerada un importante vector, ya que esta mosca tiene la probóscide más pequeña de las moscas picadoras del ganado bovino, con una probóscide de 92 μm de diámetro que difiere de las 230 μm de diámetro de la probóscide de la mosca del establo (Elzinga y Broce, 1986), un ciclo de vida con una duración de dos a tres

semanas, la hembra produce poca cantidad de huevos (100 a 200) al compararla con la postura de *Stomoxys calcitrans* (60 a 800) y aunque se alimenta de 20 a 30 veces al día, lo cual favorecería una eficiente transmisión mecánica, no es habitual que cambie de hospedero (Foil y Hogsette, 1994; Desquesnes, 2004). La frecuencia de moscas encontrada y la identificación de los parásitos en moscas picadoras son indicadores de un modelo epizoótico que difiere del modelo epizoótico típico de América latina. Los resultados nos muestran que en esta región dedicada a la ganadería especializada en producción de leche, la mosca de los cuernos *Haematobia irritans* con una mediana de 99.05% (0.0%-100%) por lote, se establece probablemente como el principal potencial vector de *T. vivax* y *T. evansi* en la zona de estudio, seguida de la mosca de los establos *Stomoxys calcitrans* con una mediana de 0.9% (0.0%-94.1%), sin embargo es necesario realizar estudios sobre la bionomía de las moscas y su capacidad vectorial.

A pesar de que la captura de vectores en esta investigación se realizó entre noviembre y febrero, tiempo que correspondió en gran parte a temporada de lluvias, no se encontraron tabanidos. No hay estudios sobre tripanosomiasis y sus vectores en zonas de vida similares a Entreríos. Sin embargo, zonas más cálidas de Colombia y Brasil reportan una relación entre las temporadas de lluvias de diferentes épocas del año y los picos de infestación por tabanidos (Parra-Henao, 2008), siendo (septiembre-octubre a diciembre-enero), los períodos con picos poblacionales de tabanidos más altos y por tanto es considerado el período de mayor riesgo para la transmisión de tripanosomas (Silva *et al.*, 2002). En Colombia y otros países de Sur América se ha asociado la transmisión de *T. vivax* principalmente con los tabanidos, sin embargo en Brasil se reportó la posible contribución de *Haematobia irritans* con la transmisión del parásito en un brote, aunque la mosca estuvo con gran densidad poblacional aún en los períodos donde no se presentaron casos de enfermedad (Batista *et al.*, 2007). A diferencia de los resultados de este estudio donde *Haematobia irritans* se establece como posible vector y estuvieron ausentes los tabanidos, un estudio sobre identificación de posibles vectores de la tripanosomiasis bovina llevado a cabo en Caucasia, norte de Antioquia implementando la misma técnica de captura de este

estudio, encontró en un período entre junio y septiembre (una vez al mes durante aproximadamente 9 horas) un total de 140 tabanidos agrupados en dos subfamilias, Tabaninae y Chrysopsinae, y distribuidas en los géneros *Tabanus*, *Lepiselaga*, *Chrysops* y *Cryptotylus*, y nueve especies. A su vez, en una mosca de la especie *T. nebulosus* hallaron flagelados compatibles con *T. vivax* en intestino medio y en dos moscas *T. occidentalis* identificaron flagelados tanto en intestino medio como en glándulas salivales (Parra-Henao, 2008), mostrando que en esta región enzoótica para la tripanosomiasis la transmisión es realizada por los típicos vectores de zonas donde la transmisión es mecánica.

El haber encontrado ambas especies de moscas picadoras infectadas con los parásitos *T. vivax* y *T. evansi* en dos de los 16 lotes evaluados, no permite concluir que en los otros lotes de bovinos no se encuentren los parásitos, ya que encontrar los parásitos en el vector depende en gran medida de la parasitemia de los bovinos infectados, y al haber encontrado en este estudio por técnicas de microscopía tan solo uno de los doce bovinos positivos a *T. vivax* (8.3%) y ningún bovino positivo a *T. evansi* con ninguna de las pruebas utilizadas, es más baja la probabilidad de encontrar moscas infectadas en una zona que no es enzoótica para la tripanosomiasis.

En siete de los once compartimentos donde se ubican los bovinos se identificaron animales positivos por PCR, no obstante tan solo uno de los compartimentos (sala 2) presentó tanto animales positivos a *T. vivax*, como moscas positivas a ambos parásitos, y sala 3, con moscas positivas a ambos parásitos no evidenció bovinos infectados. Este comportamiento está relacionado con la eficiencia en la transmisión; ya evidencia científica muestra que la eficiencia en la transmisión está relacionada con altos niveles de parasitemia, sustentado en que *T. vivax* y *T. evansi* son fácilmente transmisibles al ganado bovino y a dromedarios respectivamente, ya que los niveles de parasitemia de estos en su principal huésped (bovino y dromedarios respectivamente) son mayores (Desquesnes, 2004). A pesar de no haber encontrado *T. evansi* en los bovinos, y aunque algunos autores

reportan bajas parasitemias en este hospedero, es necesario conocer más sobre el comportamiento epizootico de este parásito en bovinos de sistemas especializados en producción de leche en Colombia, ya que en otros países han presentado al parásito como un importante patógeno de bovinos de razas lecheras, siendo causante de enfermedad subclínica, que se ha manifestado con disminución en la producción de leche en el ganado infectado, abortos y muerte súbita sin signos clínicos en estadios tardíos de la preñez (Pholpark *et al.*, 1999).

La epizootiología de la tripanosomiasis en ganadería de producción de leche especializada en esta hacienda de Entreríos evidencia un comportamiento de transmisión mecánica típico de países Suramericanos, con el agravante de estar involucrados como hospederos definitivos bovinos raza Holstein, los cuales no han coevolucionado con el parásito. Zapata y Réyes (2011) en datos sin publicar encontraron el primer caso sintomático de tripanosomiasis diagnosticado por ESP (parasitemia= 1575 Tripanosomas/ μ l) y el método Buffy coat en un lote de producción de la hacienda, luego en un período de dos semanas aparecieron otros 2 casos sintomáticos y diagnosticados por técnicas de microscopía, unas semanas después al incluirlos en el estudio tan solo uno fue positivo por técnicas moleculares, lo que muestra los períodos de parasitemia intermitentes con manifestaciones clínicas en el animal. Estos bovinos tienen en común, una edad superior a los 60 meses. De los bovinos positivos en la investigación el 50% se encuentra por encima de los 60 meses (rango= 60 – 110.4 meses), el 41.7% corresponde a bovinos menores de 30 meses (rango= 14.4 – 25.2 meses) y tan solo el 8.3% está representado por un bovino entre los 31 y 60 meses (49.2 meses). Todos los hallazgos descritos anteriormente son concordantes con el modelo de tendencia de prevalencia parasitológica de *T. vivax* y prevalencia serológica en poblaciones expuestas a vectores mecánicos, donde los 30 primeros meses posinfección corresponden a un período epizootico con parasitemias detectables e intermitentes con un pico de prevalencia serológica cerca del mes 10, período en el cual se evidencian fases clínicas de la infección, luego entre los meses 30 y 63 un período interepizootico subclínico caracterizado por parasitemias indetectables y un

descenso gradual en la inmunidad, siendo aproximadamente de los 63 meses posinfección en adelante un período epizootico en el que la prevalencia parasitológica puede incrementarse de forma impredecible con presentación de casos clínicos (Osorio *et al.*, 2008).

Haber encontrado ADN de *T. vivax* y *T. evansi* en cabeza y torax-abdomen de la mosca de los cuernos y la mosca de los establos (Figura 6) brinda elementos para establecer a estas moscas picadoras como posibles vectores mecánicos en la zona. En este estudio no fue posible determinar si los vectores están realizando transmisión cíclica. Basados en que en África la transmisión de *T. vivax* puede darse cíclica o mecánicamente, investigadores han propuesto que en Sur América puede haber transmisión cíclica por un vector diferente a *Glossina* (Osorio *et al.*, 2008; Otte *et al.*, 1994), no obstante no hay evidencia científica que sustente esta hipótesis y muchos investigadores coinciden en que la transmisión por artrópodos en Sur América es estrictamente mecánica (Desquesnes, 2004; Batista *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2011), aspecto que hace más compleja la dinámica de transmisión y el desarrollo de inmunidad protectora en la zona (Osorio *et al.*, 2008).

En la transmisión mecánica los tripomastigotes se encuentran principalmente en probóscide, pero a su vez pueden ubicarse temporalmente en intestino medio. La transmisión depende de su regurgitación. Los vectores transmiten los tripanosomas inmediatamente después de haberse contaminado, cuando al alimentarse de sangre en un hospedero infectado se ha interrumpido antes de la saciedad y el insecto vuelve a alimentarse sobre otro hospedero segundos o unos pocos minutos después. La detección de los tripanosomas en partes bucales significa que el insecto es potencialmente infeccioso y que puede ser de importancia epizootica. Sin embargo, no es común encontrar la mosca de los cuernos como vector (Desquesnes, 2004).

El modelo de regresión lineal múltiple muestra la relación que tiene una alta densidad poblacional de la mosca de los cuernos con la infección por *T. vivax* en bovinos de la zona

de estudio, ya que el modelo señala que en un incremento poblacional de vectores, por cada 500 moscas *Haematobia irritans* más en la zona de estudio puede aparecer un nuevo bovino infectado. Por tanto, es apremiante conocer la dinámica poblacional de *Haematobia irritans* a través del tiempo, y así, poder implementar un manejo integral coherente con la situación epizootica según la época del año. Esta situación está directamente relacionada con las condiciones climáticas que varían según la época del año y la zona de vida. Un estudio en México encontró que la infestación por *H. irritans* osciló, pero con presencia de moscas todo el año; la mayor infestación se observó en verano (mayo – julio), al presentarse dos picos poblacionales, la actividad en otoño e invierno también fluctuó; y se incrementó en primavera (marzo – abril), durante la cual se observó un pico poblacional (Galindo *et al.*, 2008). En la provincia de Santa Fe, Argentina se evaluó la infestación por la mosca de los cuernos en bovinos raza Holstein y los cruces Holstein x Holstein Friesian y Holstein x Jersey, no encontrando diferencias en la infestación entre cada hospedero, pero si, una dinámica poblacional fluctuante con picos en primavera (septiembre - diciembre) y en otoño (marzo - junio) (Guglielmone *et al.*, 2002). Un comportamiento diferencial se da en Pantanal, Brasil donde los picos de infestación se dan al inicio de la temporada de lluvias (noviembre a diciembre) y al final de la temporada de lluvias (mayo a julio) (Barros *et al.*, 2001). Según los estudios en diferentes países de América latina, son notables las variaciones poblacionales según la época del año, sin embargo es consistente encontrar los picos de infestación más altos por *Haematobia irritans* en temporadas de lluvias.

Al identificar los meses de alto riesgo de infestación por *Haematobia irritans* específicos de Entreríos, se podrán implementar métodos de manejo integral que impidan el desarrollo de brotes de tripanosomiasis en la zona. Los tratamientos con medicamentos comúnmente empleados en sistemas de producción de carne, son aún más limitantes para la productividad del sistema de producción de leche, a causa de los tiempos de permanencia del medicamento en la leche, siendo hasta de 21 días en leche, tiempo en el cual no se debe comercializar este producto (Mdachi *et al.*, 1995). Metodologías

enfocadas en la prevención de la transmisión iatrogénica, vigilancia epizootiológica de bovinos y reservorios provenientes de zonas enzoóticas, control de vectores mediante trampas, tratamientos químicos contra moscas periódicos y con intermitencia de los principios activos, manejo de excretas e implementación de control biológico con parasitoides y hongos entomopatógenos, son alternativas para interrumpir el ciclo de transmisión sin generar impacto negativo sobre la producción de leche (Desquesnes, 2004; Angel-Sahagún *et al.*, 2005).

Dentro de las pruebas utilizadas se probaron la técnica ESP, la cual es la técnica de rutina en los laboratorios de diagnóstico y el método Buffy coat, el cual es el método más sensible entre los métodos basados en microscopía (Nantulya, 1990). En ambas pruebas se obtuvo una detección del 8.3% de los bovinos positivos, al comparar estos resultados con los obtenidos por PCR con el marcador ILO 1264, 1265. Estos hallazgos evidencian los limitantes de estas herramientas diagnósticas en una zona no enzoótica para la tripanosomiasis debido a la baja sensibilidad de estas pruebas ya reportadas en varios estudios (Nantulya, 1990; Oliveira *et al.*, 2009; Desquesnes y Tresse, 1996) y a la tendencia a encontrar bajas parasitemias con procesos clínicos, que podrían llevar al subdiagnóstico y a la consecuente pérdida del animal. Investigadores han presentado a estas técnicas como herramientas limitadas con baja sensibilidad, incapaces de detectar animales con infección crónica y bajas parasitemias (Nantulya, 1990). Los resultados obtenidos en la detección de *T. vivax* en este estudio están relacionados con los valores de sensibilidad reportados para el ESP (10%) (Oliveira *et al.*, 2009) y el buffy coat, donde esta sensibilidad es del 100%, 80% y 50% cuando las parasitemias son mayores de 700, entre 330 y 700, y entre 60 y 300 parásitos/ml de sangre respectivamente; y no detectables cuando la parasitemia se encuentra por debajo de los 60 parásitos/ml de sangre (Desquesnes y Tresse, 1996).

Al obtener un total de 12 muestras de bovinos positivas para *T. vivax* con la técnica PCR utilizando el marcador ILO 1264, 1265 y ninguna muestra positiva para *T. vivax* ni *T. evansi*

con el marcador ITS1, se observa una mayor sensibilidad con el marcador ILO. A diferencia de los resultados obtenidos para las muestras de sangre de bovinos, las pruebas de PCR se comportaron inversamente cuando se evaluaron las muestras compuestas de moscas, encontrando para el marcador ITS1 CF BR siete muestras positivas (3 positivas para *T. vivax* y 4 positivas para *T. evansi*) de 56 muestras evaluadas y con el marcador ILO 1264, 1265 ninguna muestra positiva para *T. vivax*. Estos resultados se explican por la sensibilidad analítica o límite de detección del marcador ITS1 CF y BR, encontrado en estudios donde se realizaron diluciones seriadas y se obtuvo un límite de detección variable según la especie de *Trypanosoma*; siendo de 10 pg (100 tripanosomas) para parásitos del subgénero *Trypanozoon*, al que corresponde *T. evansi* y de 100 pg (1000 tripanosomas) para *T. vivax* (OIE/IAEA, 2007). Otros autores han obtenido en sus experimentos una sensibilidad del 88%, resultado que podrían estar relacionado con el número de copias de la secuencia (100 a 200 copias) que es considerado bajo si se compara por ejemplo con secuencias de ADN satélite que pueden contener entre 10.000 y 20.000 copias (Gonzales *et al.*, 2006), sin embargo es considerada una herramienta diagnóstica versátil que permite detectar varias especies de tripanosomas sección salivaria en una única reacción de PCR y con solo un par de *primers* (Silva *et al.*, 2002). Para el marcador ILO 1264, 1265 se ha reportado una buena sensibilidad (92%) al usar ADN extraído de sangre completa o tarjetas Whatman, ya que se ha encontrado que la técnica de extracción de ADN influye sobre la sensibilidad de diferentes marcadores (Gonzales *et al.*, 2006).

Dado que la concentración de ADN obtenida desde muestras de sangre de bovino puede ser baja, es más útil la PCR con el primer específico ILO 1264, 1265. Sin embargo, para la detección de *T. vivax* en moscas puede ser un mejor marcador el ITS1 CF y BR, ya que al obtener por la técnica de extracción Grind buffer altas concentraciones de ADN, es posible que se inhiba la reacción de PCR al utilizar el marcador ILO 1264, 1265 y se encuentre la concentración de ADN suficiente para ser detectada con el ITS1 CF y BR. En el caso de *T. evansi* y el marcador ITS1 CF y BR, parece ser que con concentraciones altas de ADN (70

ng/ μ l) la PCR se inhibe, ya que fue necesario diluir el control de *T. evansi* (1:10= 7.1 ng/ μ l) para obtener resultados apropiados. Estos hallazgos pueden estar relacionados con el mayor límite de detección de este marcador para *T. evansi* (10 pg) (OIE/IAEA, 2007).

Es posible que adicional a las bajas parasitemias y la sensibilidad de cada prueba, la detección de animales positivos se vea afectada por variantes genéticas, las cuales ya se han reportado en Kenia para *T. vivax* con cambios en las regiones de alineamiento de *primers* KIN obteniendo productos no específicos de PCR y diferentes tamaños de la región del espacio interno transcrito (ITS). Esta idea se sustenta en que el rADN de *T. vivax* está mutando de 7 a 10 veces más que la tasa de mutación de los tripanosomas no salivaria y también significativamente más rápido que las demás especies de *Trypanosoma* (OIE/IAEA, 2007).

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten concluir que la hacienda en estudio ubicada en la zona norte de Antioquia y dedicada a la ganadería de leche especializada podría sufrir alteraciones en su economía, como resultado de brotes intermitentes e impredecibles ocasionados por los flagelados *T. vivax* y *T. evansi*. Por las características de la epizootiología de la tripanosomiasis en la hacienda estudiada, este se concibe como un caso atípico de zonas enzoóticas del país y de otros países Suramericanos, donde los hospederos pertenecen a otras razas más resistentes, las condiciones ecológicas y climáticas difieren, los vectores son más eficientes en la transmisión, hay menos restricciones para el uso de antiparasitarios, entre otros factores. No obstante, de por sí, el comportamiento epizoótico de la tripanosomiasis bovina en América Latina es preocupante, porque a diferencia de otra de las principales enfermedades hemoparasitarias del bovino como es la babesiosis, la cual, por las características de su epizootiología permiten el desarrollo de inmunidad protectora en bovinos de diferentes zonas del país donde se hace un buen manejo de la ganadería; la entidad clínica

ocasionada por *T. vivax* en países donde la transmisión es mecánica se establece como un proceso infeccioso complejo, mediado principalmente por la ineficiente tasa de transmisión y el limitado desarrollo de respuesta inmune que conlleva a un proceso de inestabilidad enzoótica.

Agradecimientos

A la Escuela de Microbiología y la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia. A los propietarios, médicos veterinarios, zootecnistas y vaqueros de la hacienda donde se realizó el estudio.

Referencias

Angel-Sahagún CA, Lezama-Gutiérrez R, J. Molina-Ochoa², Galindo-Velasco E, López-Edwards M, Rebolledo-Domínguez O, Cruz-Vázquez C, Reyes-Velázquez WP, Skoda SR and Foster JE. Susceptibility of biological stages of the horn fly, *Haematobia irritans*, to entomopathogenic fungi (Hyphomycetes). J Insect Sci. 2005; 5: 1-8.

Barros ATM. Dynamics of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) infestation on Nelore cattle in the Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001; 96 (4):445-450.

Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MG, Madruga CR, Simoes SDV and Maia TF. Tripanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semi-arid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. Vet Parasitol 2007; 143: 174–181.

Batista JS, Rodrigues CM, Olinda RG, Silva TM, Vale RG, Câmara AC, Rebouças RE, Bezerra FS, García HA and Teixeira MM. Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental transmission. Parasitol Res 2011; (Epub ahead of print).

Betancourt AE and Julio TM. La técnica de centrifugación en tubo capilar y el diagnóstico de infecciones naturales por *Trypanosoma* sp. Revista ICA 1979; 14: 105-108.

Betancourt A and Wells AE. Pérdidas económicas en un brote de tripanosomiasis bovina causado por *Trypanosoma vivax*. Rev Asoc Columb Med Vet Zoot. 1979; 3: 6-9.

Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU and Ribeiro MFB. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 169: 320–326

Dávila AM and Silva RA. animal trypanosomiasis in South America current status, partnership, and information technology. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 916:199-212.

Dávila AM, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS and Traub-Cseko YM. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 2003; 117: 1–13.

Desquesnes M. Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. France (Paris): OIE (World organization for animal health); 2004.

Desquesnes M and Tresse L. Evaluation of the sensitivity of the Woo test for the detection of *Trypanosoma vivax*. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 1996; 49: 315-321.

Elzinga RJ and Broce AB. Labellar modifications of Muscomorpha flies (Diptera). *Annals of the entomological Society of America.* 1986; 79: 150-209.

Esievo KAN and Saror DI. Leukocyte response in experimental *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *J Comp Path.* 1983; 93: 165-169.

FAO/IAEA Programme of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Developing Methodologies for the Use of Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis and Monitoring of Trypanosomosis. Vienna (Austria): IAEA; 2007.

FINAGRO. Sistema de información sectorial SIS. Ganadería. 2008. Fecha de acceso agosto 2 de 2011. URL: <http://mvz.unipaz.edu.co/textos/manuales/ganaderia.pdf>

Foil LD and Hogsette JA. Biology and control of tabanids stable flies and horn flies. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 1994; 13: 1125-1158.

Galindo-Velasco E, Carlos Cruz-Vázquez C, Lezama-Gutiérrez R, Reyes-Velázquez W, Aguilar-Espinoza S and Pescador-Rubio A. Fluctuación poblacional de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en un hato bovino en Tecomán, Colima, México. Vet. Méx. 2008; 39 (2): 181-186.

García H, Aguirre AM, Pérez G and Mendoza-León A. Serological and Parasitological Diagnosis of Tripanosomiasis Infections in Two Water Buffaloes Herds (*Bubalus bubalis*) in Guarico State. Rev Fac Cs Vets UCV 2001; 42: 15-26.

Gonzales JL, Loza A and Chacon E. Sensitivity of different Trypanosoma vivax specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. Vet Parasitol. 2006; 136: 119-126.

Guglielmone AA, Volpogni MM, Castro H, Mangold AJ, Anziani OS. A study of relative horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), abundance on Holstein steers and steers of two Holstein crosses. Vet Parasitol. 2002; 109: 141-145.

Harry, P. and Stojanovicch. Pictorial keys arthropods reptils, birds and mammals of public-health significance. U.S. Departament of healt, education, and welfare public. Health service. U.S. Government priting office Washingthon. 1969.

Herrera HM, Dávila AM, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS and Jansen AM. Enzootiology of Trypanosoma evansi in Pantanal, Brazil. Vet Parasitol. 2004 Nov 10;125(3-4):263-75.

Jones TW and Dávila AM. *Trypanosoma vivax* - out of Africa. Trends in Parasitology. 2001; 17 (2): 99-101.

Masake RA, Majiwa PAO, Mooloo SK, Makau JM, Njuguna JT, Maina M, Kabata J, Ole-MoiYoi OK and Nantulya VM. Sensitive and specific detection of *T. vivax* using polymerase chain reaction. Exp. Parasitol. 1997; 85: 193-205.

Mateus G, Garcia O and Leon J. Use of trypanidum in an integrated control method of *Trypanosoma vivax* in Colombia. In Premier Séminaire International sur les Trypanosomose Animales Non Transmises par les Glossines. Annecy, France. 1992; 14-16.

Mateus G. and González M. Características de un brote de *Trypanosoma vivax* en Colombia. Rev. Club Cienc. Vet. 1991; 22: 167-172.

Mdachi RE, Muilla GA, Omukuba JN and Cagnolati V. Disposition of diminazene aceturate (BerentilR in trypanosome-infected pregnant and lacting cows. Vet. Parasitol. 1995; 58: 215-225.

Morrison LJ, Marcello L and McCulloch R. Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. Cellular Microbiology, 2009; 11 (12): 1724-1734.

Nantulya VM. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. Rev. Sci. Tech. 1990; 9: 357-367.

Oliveira JB, Hernández-Gamboa J, Jiménez-Alfaro C, Zeledón R, Blandón M and Urbina A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. Vet Parasitol. 2009 Jul 7; 163(1-2):136-9.

Osório AL, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LR and Costa SC. *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008 Feb; 103(1):1-13.

Otte MJ , Abuabara JY and Wells EA. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. Trop. Anim. Hlth Prod. 1994; 26: 146-156.

Parra-Henao G, Alarcon-Pineda EP and Lopez-Valencia G. Ecología y análisis parasitológico de tábanos (Diptera: Tabanidae) en Antioquia, Colombia. *Caldasia*, ene./jun. 2008, vol.30, no.1, p.179-188. ISSN 0366-5232.

Pholpark S, Pholpark M, Polsar C, Charoenchai A, Paengpassa Y and Kashiwazaki Y. Influence of *Trypanosoma evansi* infection on milk yield of dairy cattle in northeast Thailand. Preventive Veterinary Medicine. 1999; 42: 39-44.

Quintero MMT. Moscas transmisoras de enfermedades. Memorias del Curso Teórico-Práctico de Artrópodos Transmisores de Enfermedades; 1991 octubre 12-14; México (DP): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1991: 115-134.

Silva RAMS, Seidl S, Ramirez L and Dávila AM. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*: biología, diagnóstico e controle. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

Soulsby J. Parasitología y enfermedades parasitarias. 7ª edición. México: Ed. Interamericana., 1987.

Vargas TM and Arellano SC. La tripanosomiasis bovina en América Latina y el Caribe. Revista Veterinaria. 1997; 33: 17-21.

Wells EA, Betancourt A and Ramírez IE. *Trypanosoma vivax* in Colombia: interpretation of field results. Trop Anim Health Prod 1982; 14: 141-150.

Zapata R, Mesa J, Mejía J, Reyes J and Ríos LA: Frecuencia de infección por *Trypanosoma sp.* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en cuatro hatos bufaleros de Barrancabermeja, Colombia. Rev Colomb Cienc Pecu 2009; 22:25-32.

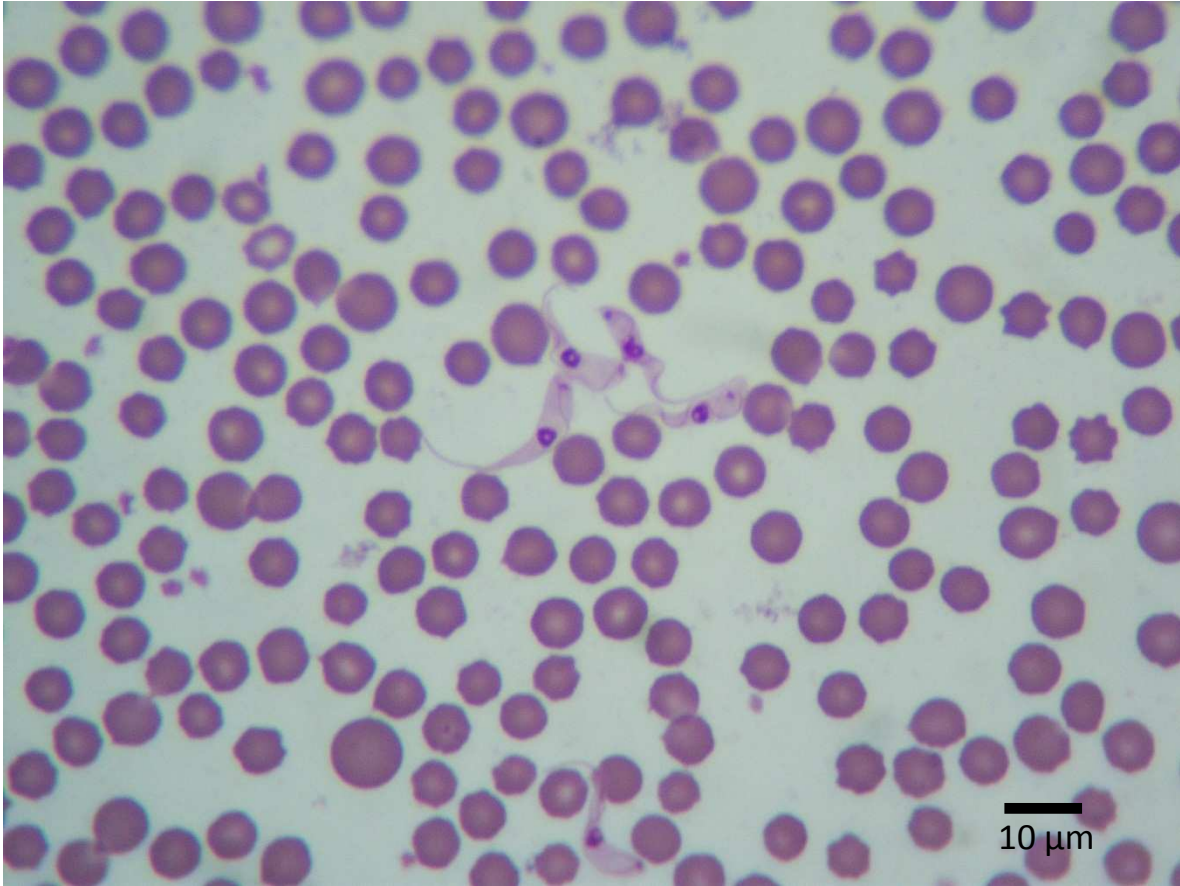


Figura 2. Tripomastigotes de *Trypanosoma vivax* en extendido de sangre periférica de bovino raza Holstein, coloreado con Hemacolor (Merck). Aumento de 400x.

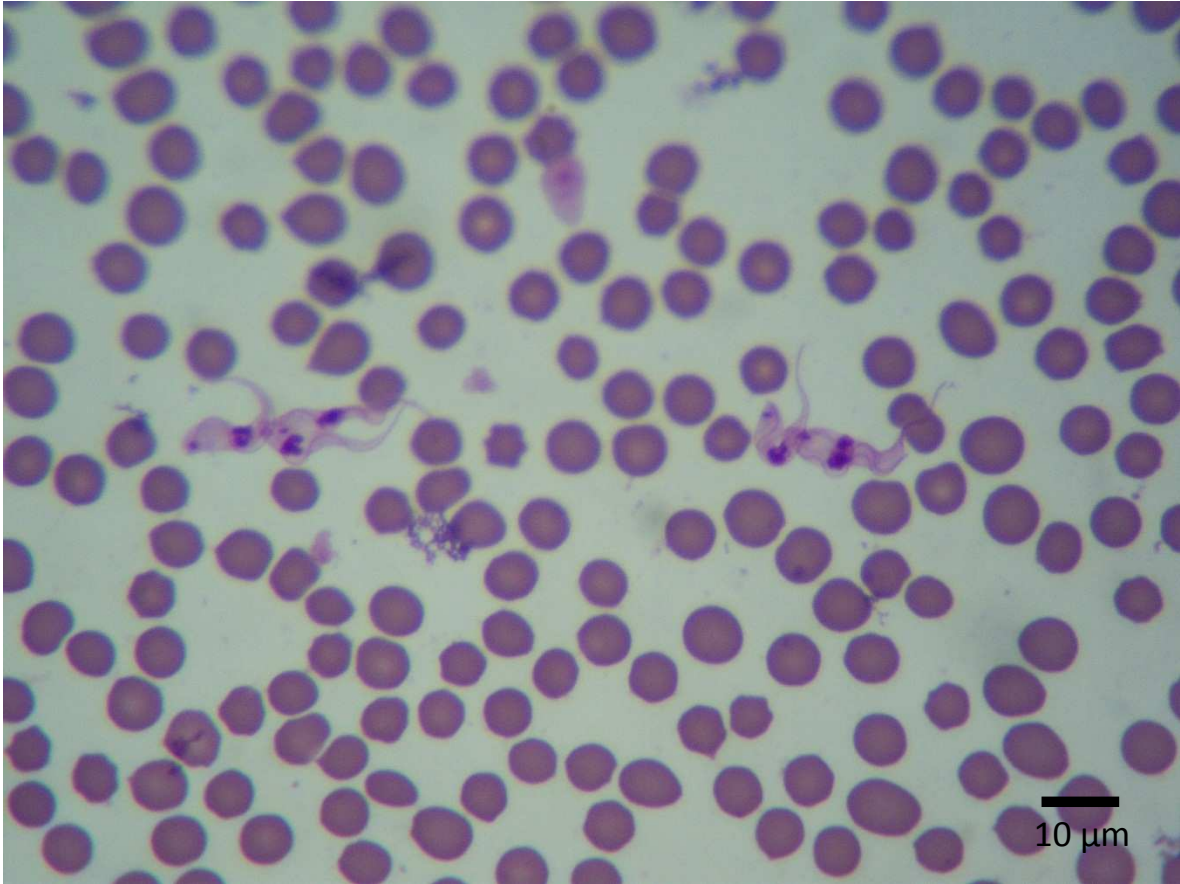


Figura 3. Tripomastigotes de *Trypanosoma vivax* realizando fisión binaria. Foto tomada de extendido de sangre periférica de bovino raza Holstein, coloreado con Hemacolor (Merck) en aumento de 400x.

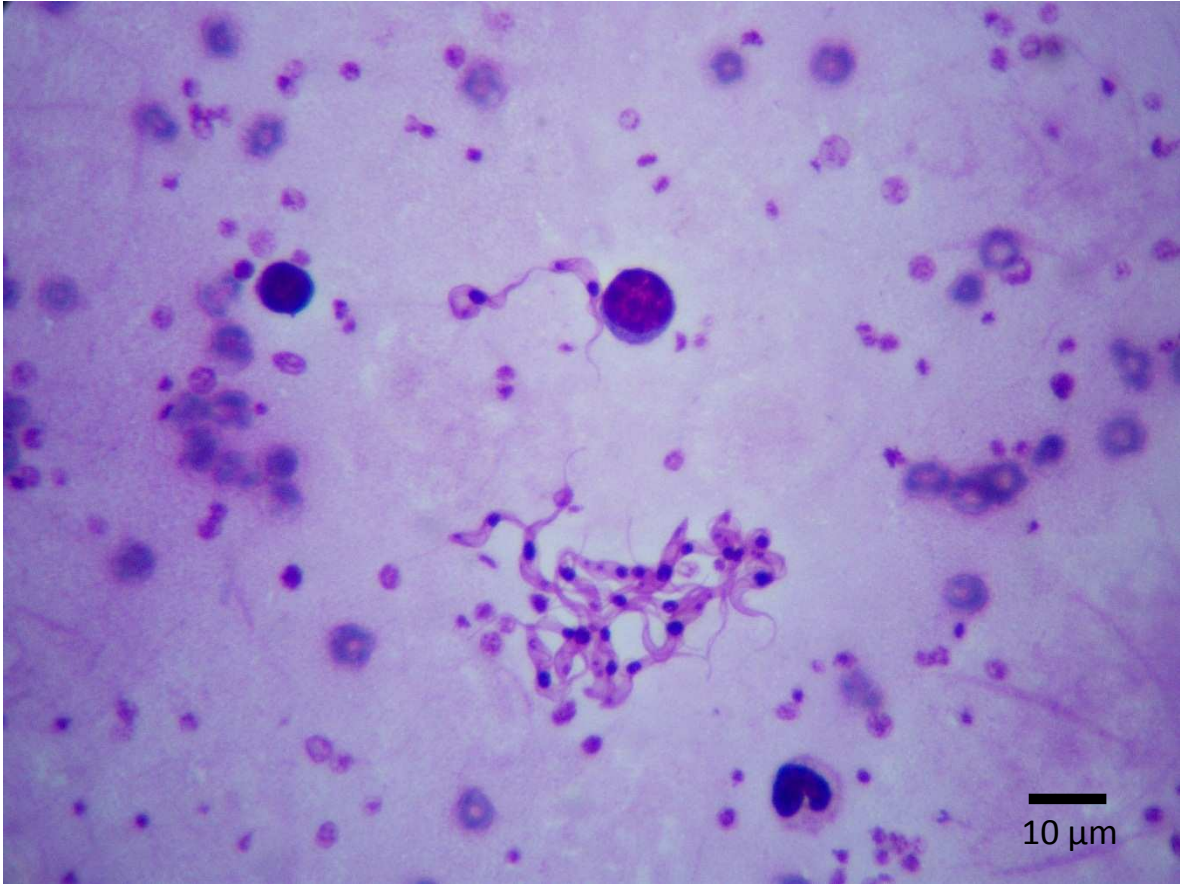


Figura 4. Agregación de tripomastigotes de *Trypanosoma vivax* identificados en bovino raza Holstein por el método Buffy coat coloreado con Hemacolor (Merck). Aumento de 400x.

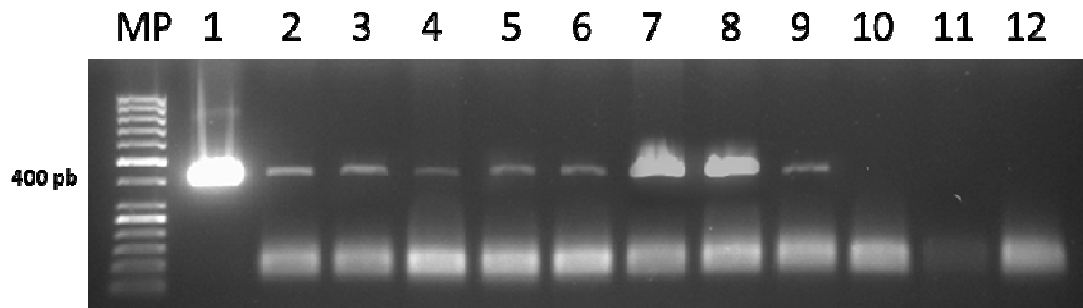


Figura 5. Productos de amplificación de la PCR – marcador ILO 1264, 1265 generados a partir de muestras de sangre de bovinos infectados con *Trypanosoma vivax* (banda de 400 pb). MP: marcador de peso molecular, 1: control positivo de *Trypanosoma vivax*, 2 – 9: muestras positivas para *Trypanosoma vivax*, 10: control *Trypanosoma cruzi*, 11: control *Trypanosoma theileri* y 12: control negativo.

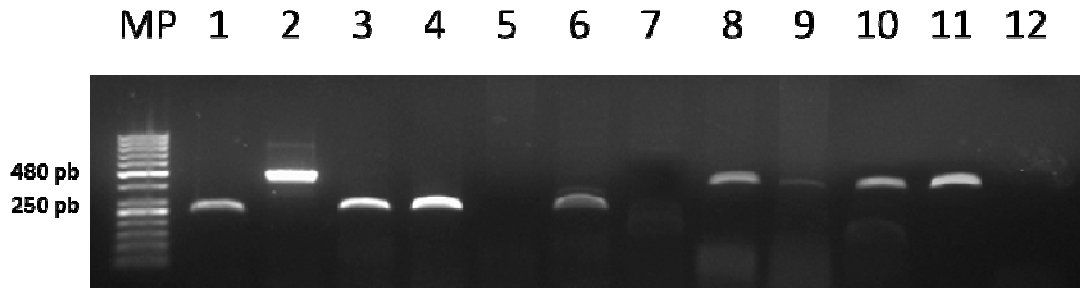


Figura 6. Productos de amplificación de la PCR – ITS1 CF BR generados a partir de muestras de moscas *Haematobia irritans* y *Stomoxys calcitrans* infectadas con *Trypanosoma vivax* (banda de 250 pb) y *Trypanosoma evansi* (banda de 480 pb). MP: marcador de peso molecular, 1: control positivo de *Trypanosoma vivax*, 2: control positivo de *Trypanosoma evansi*, 3: *Trypanosoma vivax* en probóscide de *Haematobia irritans*, 4: *Trypanosoma vivax* extraído de tórax-abdomen de *Haematobia irritans*, 5: control *Trypanosoma theileri*, 6: *Trypanosoma vivax* en probóscide de *Stomoxys calcitrans*, 7: control *Trypanosoma cruzi*, 8: *Trypanosoma evansi* en probóscide de *Stomoxys calcitrans*, 9: *Trypanosoma evansi* extraído de tórax-abdomen de *Stomoxys calcitrans*, 10: *Trypanosoma evansi* en probóscide de *Haematobia irritans*, 11: *Trypanosoma evansi* extraído de tórax-abdomen de *Haematobia irritans* y 12: control negativo.