

**Universidad Nacional
Facultad Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

**Diagnóstico molecular de *Trypanosoma vivax* mediante la técnica
de PCR en bovinos de seis fincas lecheras de la Región Huetar
Norte y Región Huetar Atlántica de Costa Rica**

Modalidad: Tesis de grado

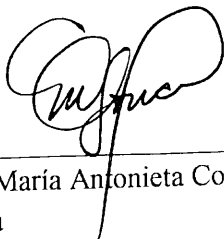
**Trabajo final de graduación para optar por el grado académico de
Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Claudia Vargas Calderón

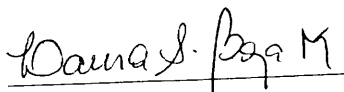
Campus Presbítero Benjamín Núñez

2014

TRIBUNAL EXAMINADOR



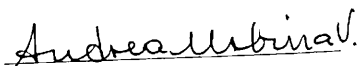
M.Sc. María Anjonieta Corrales
Decana
Facultad de Ciencias de la Salud



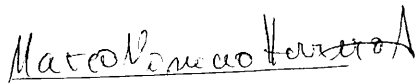
Lic. Laura Bouza
Subdirectora
Escuela de Medicina Veterinaria



M.Sc. Melisa Blandón
Tutora



M.Sc. Andrea Urbina
Lectora



Ph.D. Marco V. Herrero
Lector

Fecha 05/08/14

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dedicado a mi Dios que ha sido mi fuerza y mi apoyo en todo momento. Les agradezco profundamente a mis padres y familia, quienes me han ayudado a seguir adelante; así como a mi tutora Melissa Blandón y a mis lectores, la Dra. Andrea Urbina y el Dr. Marco V. Herrero, así como al Dr. Juan José Romero, quienes me han brindado siempre su ayuda y guía durante este proyecto.

Extiendo mis agradecimientos al Dr. Néstor Añez del Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Los Andes en Mérida, Venezuela, por facilitarnos la cepa positiva de *Trypanosoma vivax*, aislada en dicho país, la cual fue utilizada en este estudio como control positivo. También debo mencionar la importante colaboración en este estudio, que representaron el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICIT) y el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) como financiadores del proyecto; así como, la participación de los propietarios de los establecimientos ganaderos que fueron muestreados, ya que su disposición y buena voluntad fueron cruciales para la finalización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR.....	ii
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Antecedentes.....	14
<i>1.1.1. Epidemiología.....</i>	<i>14</i>
<i>1.1.2. Etiología y ciclo de vida.....</i>	<i>16</i>
<i>1.1.3. Transmisión y patogenia.....</i>	<i>17</i>
<i>1.1.4. Signos clínicos.....</i>	<i>18</i>

<i>1.1.5. Hospederos</i>	20
<i>1.1.6. Diagnóstico</i>	20
<i>1.1.7. Tratamiento y control</i>	22
1.2. Justificación	23
<i>1.2.1. Importancia</i>	23
<i>1.2.2. Hipótesis</i>	25
1.3. Objetivos	25
<i>1.3.1. Objetivo general</i>	25
<i>1.3.2. Objetivos específicos</i>	25
2. METODOLOGÍA	27
2.1. Materiales y métodos	27
<i>2.1.1. Sitio del muestreo</i>	27
<i>2.1.2. Toma de la muestra</i>	30
<i>2.1.3. Extracción de ADN</i>	30
<i>2.1.4. Diagnóstico molecular de <u>Trypanosoma vivax</u> por medio de la PCR</i>	30
<i>2.1.5. Secuenciación y análisis de los resultados positivos</i>	31
<i>2.1.6. Tipo de estudio y población a muestrear</i>	32

3. RESULTADOS.....	34
3.1. Población analizada.....	34
3.2. Estimación del porcentaje de positividad e incidencia parcial de <i>T. vivax</i>.....	36
<i>3.2.1. Distribución por edad de los individuos positivos a <u>T. vivax</u>.....</i>	<i>46</i>
<i>3.2.2. Distribución de los individuos positivos a <u>T. vivax</u> por raza en la Finca 2.....</i>	<i>49</i>
4. DISCUSIÓN.....	50
4.1. Conclusiones.....	62
4.2. Recomendaciones.....	62
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
5.1. Referencias electrónicas.....	68
6. ANEXOS.....	70
<i>Anexo 6.1.1. Diagrama para la clasificación de las zonas de vida.....</i>	<i>70</i>
<i>Anexo 6.1.2. Mapa ecológico de Costa Rica (Zonas de vida).....</i>	<i>71</i>
<i>Anexo 6.2.1. Individuos positivos a <u>T. vivax</u> en la Finca 1.....</i>	<i>72</i>
<i>Anexo 6.2.2. Individuos positivos a <u>T. vivax</u> en la Finca 2.....</i>	<i>73</i>
<i>Anexo 6.2.3. Individuos positivos a <u>T. vivax</u> en la Finca 3.....</i>	<i>74</i>
<i>Anexo 6.2.4. Individuos positivos a <u>T. vivax</u> en la Finca 4.....</i>	<i>75</i>

Anexo 6.2.5. Individuos positivos a T. vivax en la Finca 5..... 76

Anexo 6.2.6. Individuos positivos a T. vivax en la Finca 6..... 77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de animales muestreados y analizados.....	34
Cuadro 2. Número de individuos positivos a <i>T. vivax</i> por finca en cada muestreo.....	36
Cuadro 3. Porcentaje de positividad de <i>T. vivax</i> en la Finca 1.....	37
Cuadro 4. Incidencia parcial de <i>T. vivax</i> en la Finca 1.....	38
Cuadro 5. Porcentaje de positividad de <i>T. vivax</i> en la Finca 2.....	38
Cuadro 6. Incidencia parcial de <i>T. vivax</i> en la Finca 2.....	39
Cuadro 7. Porcentaje de positividad de <i>T. vivax</i> en la Finca 3.....	40
Cuadro 8. Incidencia parcial de <i>T. vivax</i> en la Finca 3.....	40
Cuadro 9. Porcentaje de positividad de <i>T. vivax</i> en la Finca 4.....	41
Cuadro 10. Incidencia parcial de <i>T. vivax</i> en la Finca 4.....	41
Cuadro 11. Porcentaje de positividad de <i>T. vivax</i> en la Finca 5.....	42
Cuadro 12. Incidencia parcial de <i>T. vivax</i> en la Finca 5.....	43
Cuadro 13. Porcentaje de positividad de <i>T. vivax</i> en la Finca 6.....	43
Cuadro 14. Incidencia parcial de <i>T. vivax</i> en la Finca 6.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia del fragmento de 173 pb de <i>Trypanosoma vivax</i>.....	35
---	-----------

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Incidencias parciales de <i>T. vivax</i> en las fincas analizadas.....	45
Gráfico 2. Porcentaje de individuos positivos a <i>T. vivax</i> distribuidos según la edad en la Finca 2.....	46
Gráfico 3. Porcentaje de individuos positivos a <i>T. vivax</i> distribuidos según la edad en la Finca 3.....	47
Gráfico 4. Porcentaje de individuos positivos a <i>T. vivax</i> distribuidos según la edad en la Finca 4.....	47
Gráfico 5. Porcentaje de individuos positivos a <i>T. vivax</i> distribuidos según el número de partos en la Finca 5.....	48
Gráfico 6. Porcentaje de individuos positivos a <i>T. vivax</i> distribuidos según el número de partos en la Finca 6.....	48
Gráfico 7. Porcentaje de individuos positivos por raza en la Finca 2.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: Ensayo inmunológico asociado a enzimas

I: Incidencia

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

% P: Porcentaje de positividad

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

TVW-A: Cebador progresivo de *Trypanosoma vivax*

TVW-B: Cebador reverso de *Trypanosoma vivax*

RESUMEN

La tripanosomiasis en los rumiantes americanos es causada principalmente por el protozooario hemoparásito *Trypanosoma vivax*. La enfermedad puede generar un grave deterioro en la salud animal y grandes pérdidas económicas en el sector productivo.

En este estudio se implementó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *T. vivax* en sangre total bovina, en varias localidades de la Región Huetar Norte y de la Región Huetar Atlántica de Costa Rica. Se determinó la presencia del parásito en el ganado durante los meses de mayo, junio, agosto, setiembre, octubre y noviembre del año 2010.

La sangre se extrajo por punción en la vena coccígea de bovinos lecheros adultos, hembras, de las razas Holstein, Jersey, Pardo Suizo y sus cruces. Los productos obtenidos de la PCR fueron secuenciados y mostraron homología del 98% al compararlos con los datos de la red global Gen Bank. Con estos resultados, se calcularon los porcentajes de positividad e incidencia para este parásito en cada una de las fincas muestreadas.

La técnica de PCR fue útil para el diagnóstico de *T. vivax*, confirmando la presencia del parásito en 150 de 190 animales analizados (78.9%) en las zonas de estudio. Se demostró que el ciclo de transmisión está activo ya que se presentaron nuevos casos en las fincas estudiadas. Durante el periodo de estudio no se reportaron animales que presentaran enfermedad clínica compatible con la tripanosomiasis causada por *T. vivax*, debido posiblemente a la tripanotolerancia propia de ciertas razas o individuos. Se discuten posibles causas de la infección.

ABSTRACT

American trypanosomiasis in ruminants is caused mainly by the protozoan hemoparasite *Trypanosoma vivax*. The disease may cause severe clinical manifestations with relevant economic impact in the productive sector.

In this study the polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of *T. vivax* was implemented using whole bovine blood obtained from dairy cattle in various localities of the North Huetar and the Atlantic Regions of Costa Rica. The parasite was detected during the months of May, June, August, September, October and November 2010.

Blood was collected by puncture of the coccygeal vein of adult females of Holstein, Jersey, Brown Swiss breeds and their crosses. The obtained PCR products were sequenced and showed 98% homology when compared with data from the global network Gen Bank. With these results, the percentages of positivity and incidence for this parasite in each of the sampled farms were calculated.

The PCR was able to detect the presence of *T. vivax* in 150 out of 190 animals (78.9%) tested in the study areas. It was shown that the transmission cycle was active since new cases between occurred in studied the farms. This finding suggests the ease with which this parasite is transmitted between animals. During the period of study no animals with clinical disease were observed probably due to trypanotolerance of certain breeds or individuals. Possible causes of infection are discussed.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

1.1.1. Epidemiología

La tripanosomiasis en los rumiantes americanos es causada principalmente por el protozooario hemoparásito *Trypanosoma vivax*. Su importancia en la medicina veterinaria se debe al potencial de acarrear severas pérdidas económicas debido a su impacto en la producción, la ganancia de peso, la reproducción, e incluso la supervivencia de los animales afectados (Morlais et al., 2001; Quispe et al., 2003; Uzcanga et al., 2004; Bezerra et al., 2008).

Este hemoparásito se introdujo en Latinoamérica a finales del siglo XIX mediante la importación de ganado proveniente de África; siendo detectado por primera vez en 1919 en La Guyana Francesa. Desde entonces existen diversos reportes del parásito y su enfermedad en varios países de Centro y Suramérica. Para 1977, ya se reportaba la detección de anticuerpos del parásito en El Salvador, Ecuador, Costa Rica, Perú y Paraguay (Jones y Dávila, 2001; Ventura et al., 2001; Batista et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

La diseminación de esta parasitosis en el continente americano fue favorecida por el tráfico descontrolado de animales infectados entre las fronteras internacionales, sumándose a la facilidad del parásito para transmitirse mecánicamente a través de la picadura de insectos hematófagos, como los tábanos, moscas del establo (*Stomoxys* spp.), culicoides, garrapatas, vampiros e incluso de manera iatrogénica con instrumental o agujas contaminadas (Peña et al., 2000; Jones y Dávila, 2001; Rodríguez-Vivas et al., 2003; Cortez et al., 2009; Cuglovici et al., 2010).

En la última década, la prevalencia de *T. vivax* en varios países latinoamericanos ha sido estimada a través de métodos parasitológicos, serológicos y moleculares; obteniendo valores altos para zonas endémicas como el Pantanal Brasileño y la Amazonia. En otros países los rangos son muy variados, pues para zonas como Coronel Portillo, en Perú, van desde el 5% al 22%; en Venezuela, oscilan entre el 20.8% y el 57.8%, y en El Salvador, alrededor del 15% (Quispe et al., 2003; Bolívar et al., 2006; Batista et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

En Costa Rica, los reportes de tripanosomiasis en el ganado bovino se reducen a especies poco patógenas u oportunistas, como por ejemplo, *Trypanosoma theileri* o *T. evansi*, que no afectan de manera significativa la salud del animal bajo condiciones fisiológicas normales (Evans, 1983).

La infección por *T. vivax* no había sido reportada anteriormente en los bovinos del país, hasta que se produjo un brote de hemoparasitosis entre octubre de 2007 y julio de 2008, en un hato lechero del distrito de Río Cuarto, en Alajuela (Región Huetar Norte) (Oliveira et al., 2009).

Los animales afectados presentaron fiebre, anemia severa, ictericia, abortos, nacimientos prematuros, pérdida de apetito, disminución en la producción de leche y una acentuada pérdida de peso en un corto período de tiempo. Mediante un muestreo se recolectó la sangre de varios bovinos. Al analizar al microscopio los frotis de sangre teñidos con Giemsa, se determinó la presencia de distintos agentes, como *Anaplasma marginale* en diecisiete individuos, *T. vivax* en nueve y *Babesia bovis* en dos de ellos; además, tres presentaban una infección mixta por *A. marginale* y *T. vivax*, constituyéndose éste, en el primer reporte de la enfermedad en Costa Rica (Oliveira et al., 2009).

Esta parasitosis se ha relacionado con el aumento reciente en la población de moscas hematófagas (como por ejemplo, *Stomoxys calcitrans*), hecho que ha sido propiciado por las plantaciones de piña y el inadecuado manejo de sus desechos, lo que provee el sustrato ideal para su reproducción (García et al., 2009; Oliveira et al., 2009). El incremento en la población de moscas tiene un impacto directo en los bovinos, que actúan como fuente de alimento para los insectos, los cuales, se comportan como vectores mecánicos favoreciendo la transmisión de hemoparásitos (Morlais et al., 2009; Cuglovici et al., 2010).

Otros factores que favorecen al *T. vivax*, son las condiciones ambientales y geográficas de la zona; las tierras son extensas, húmedas, con altas temperaturas y presentan una época seca muy variable. Todas estas condiciones exigen más de la resistencia física de los bovinos lecheros, y favorecen la reproducción de los insectos hematófagos (Bolaños et al., 2005; Castro y Treviño, 2006; García et al., 2009).

1.1.2. Etiología y ciclo de vida

El *T. vivax* pertenece al Subphylum Mastigophora, la clase Zoomastigophora, el orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma* y subgénero *Duttonella*. Es un grupo de protozoarios tripanosomátidos de morfología hidrodinámica, con cinetoplastos terminales grandes, flagelos libres marcados y membranas ondulantes poco aparentes. Su morfología es normalmente fusiforme, como tripomastigotes poseen un complejo cinetoplástico posterior y una porción de flagelo libre. Son organismos monomórficos grandes (18-26 μm longitud) sumamente activos en la sangre de los frotis que aún se conservan húmedos (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

El *T. vivax* tiene un ciclo de vida heteroxeno, en el cual utiliza a huéspedes invertebrados para transmitirse de manera inoculativa entre huéspedes vertebrados. Esta transmisión ocurre al ser regurgitado por los insectos hematófagos durante su alimentación, ya que el parásito se encuentra alojado en la parte anterior del tubo digestivo, probóscide y glándulas salivales de los mismos. Este tipo de transmisión inoculativa puede ser tanto cíclica como mecánica; la primera, se produce cuando el *T. vivax* utiliza como vector biológico a la mosca Tse-tsé, reproduciéndose activamente por unas tres semanas en su interior, y aglomerándose en las glándulas salivales o probóscide hasta que el insecto se alimente de nuevo. Si la transmisión es mecánica, el *T. vivax* simplemente se transporta de un huésped vertebrado a otro, utilizando como vectores mecánicos a otras especies de moscas e insectos hematófagos, o incluso fómites, en los que no se produce multiplicación del protozoario (Navarrete y Acosta, 1999; Jones y Dávila, 2001; Bolívar et al., 2006).

Una vez dentro del huésped vertebrado, *T. vivax* ingresa a la sangre y se multiplica activamente por medio de fisión binaria longitudinal simple. Esto puede ocurrir de forma continua aumentando la parasitemia, o bien, el parásito puede multiplicarse de forma discontinua, deteniendo temporalmente su reproducción para acantonarse en los tejidos del huésped (nódulos linfáticos, hígado, bazo, por ejemplo). Los parásitos que se encuentran libres en la sangre son succionados por los insectos hematófagos al alimentarse, y son transportados a otro huésped vertebrado, volviendo a comenzar el ciclo (Navarrete y Acosta, 1999).

1.1.3. Transmisión y patogenicia

La transmisión ocurre a través de la picadura de insectos hematófagos. En África, el vector primario es la mosca tse-tsé, que puede actuar como vector biológico o mecánico,

transmitiendo el parásito a través de la saliva cuando se alimenta de algún animal. Existen tres especies principales de mosca tse-tsé involucradas en la transmisión de *T. vivax*, a saber, *Glossina morsitans*, *G. palpalis* y *G. fusca*. Los tripanosomátidos también son transmitidos mecánicamente por otras moscas picadoras por la transferencia de sangre de un animal a otro, esto ocurre tanto en África como en Latinoamérica. Los vectores mecánicos más importantes son las moscas del género *Tabanus*, pero las moscas de los géneros *Haematopota*, *Liperosia*, *Stomoxys* y *Chrysops* también han sido implicadas, junto con los culicoides, garrapatas y vampiros. La transmisión puede ocurrir también por vía transplacentaria y de manera iatrogénica con instrumental o agujas contaminadas (Peña et al., 2000; Jones y Dávila, 2001; Rodríguez-Vivas et al., 2003; Bolívar et al., 2006).

La multiplicación inicial ocurre en el sitio de inoculación en la piel, siendo el periodo de incubación para *T. vivax* de cuatro a cuarenta días. Luego los tripanosomas se diseminan a los nódulos linfáticos y a la sangre donde continúan multiplicándose activamente. Los anticuerpos desarrollados contra la capa de glicoproteína del *T. vivax* lo destruyen y se desarrollan complejos inmunes. Sin embargo, no se elimina la infección ya que el parásito altera sus glicoproteínas de superficie para evadir a los anticuerpos (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

1.1.4. Signos clínicos

El depósito de complejos inmunes puede interferir con la función normal de ciertos órganos, generando lesiones como la glomerulonefritis, opacidad de la córnea y cristalino. *T. vivax* puede inducir una profunda inmunosupresión, que disminuye la respuesta del huésped a otras infecciones, permitiendo ocasionalmente que enfermedades secundarias compliquen las

características clínicas y patológicas de la tripanosomiasis (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

El principal signo clínico en la tripanosomiasis por *T. vivax* en bovinos es la anemia severa, usualmente de tipo hemolítico inmunomediado, donde la destrucción eritrocitaria ocurre tanto intravascular como extravascularmente. La disminución en el número de eritrocitos también se ve influenciada por el daño directo a estas células causado por los tripanosomas de manera mecánica o a través de la liberación de factores hemolíticos y antígenos. Así mismo, *T. vivax* provoca depresión de la médula ósea, lo que reduce la producción de eritrocitos y otras células sanguíneas, generando una profunda inmunosupresión. Esta enfermedad genera la aparición de hemorragias internas y externas (condición que puede empeorar dependiendo de la cepa de *T. vivax*) que contribuyen a empeorar el cuadro anémico ya presente en el animal (García et al, 2001; Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al, 2000, Suárez et al., 2003).

Otros signos clínicos son la fiebre intermitente que acompaña los periodos de alta parasitemia, la presencia de edema, marcada pérdida de peso, linfadenopatía generalizada, petequias, hepatomegalia, esplenomegalia, ascitis, hidrotórax, hidropericardio y edema pulmonar. Consecuentemente, se producen abortos, nacimientos prematuros, retrasos en el crecimiento, pérdida del apetito, infertilidad, reducción en la producción de leche, signos nerviosos y finalmente la muerte de los animales afectados (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al, 2000; Bolívar et el., 2006; Batista et al., 2009; Gómez-Piñeres et al., 2009).

1.1.5. Hospederos

El *T. vivax* afecta principalmente a los ungulados silvestres y domésticos, entre ellos, los bovinos, búfalos, caprinos, ovinos, camellos y ciervos, también produce una enfermedad benigna en equinos y crónica en caninos. Existen más de 30 especies de animales silvestres que pueden actuar como portadores de éste parásito. Por ello, la cercanía de otras especies de animales, domésticos o no, representa la presencia de hospederos vertebrados que a través diversos vectores mecánicos pueden propiciar la reinfección del ganado bovino, siendo que de por sí, los rumiantes ya son reservorios activos del parásito (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000; Bolívar et al., 2006).

1.1.6. Diagnóstico

Por lo general, la identificación de *T. vivax* se lleva a cabo por medio de métodos serológicos y parasitológicos, que a pesar de ser menos costosos y de ejecución simple, pueden resultar poco sensibles o poco específicos (Desquesnes y Dávila, 2002).

Con los métodos parasitológicos, *T. vivax* puede ser observado fácilmente en las fases tempranas de la infección cuando la parasitemia es alta, por examen microscópico de frotis de sangre que aún se encuentran húmedos, o bien, en frotis gruesos teñidos con Giemsa. Cuando la parasitemia es baja, los frotis del buffy coat obtenido por centrifugación de la sangre en tubos para microhematocrito, pueden ser útiles para demostrar los parásitos. También se puede observar este tripanosoma en los frotis teñidos de nódulos linfáticos (Peña et al, 2000; Desquesnes y Dávila, 2002; Bolívar et al., 2006).

Los métodos serológicos como la prueba de ensayo inmunoenzimático adsorbente (ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) son mucho más sensibles, pero no discriminan entre las infecciones recientes y las más antiguas. También pueden existir reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos que presentan similitud antigénica con *T. vivax* (Peña et al., 2000; Bolívar et al., 2006).

Sin embargo, recientemente los métodos biomoleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han sido utilizados para demostrar infecciones activas en animales sintomáticos o asintomáticos, con o sin parasitemia detectable (Bolívar et al., 2006; Thumbi et al., 2008). Para esta detección, resulta útil el empleo de cebadores moleculares especie-específicos que permiten utilizar pequeñas cantidades de ADN y conseguir la amplificación de la secuencia de interés (Luque y Herráez, 2001; Gasser et al., 2006) convirtiéndose así en un método ideal para comprobar la hemoparasitosis por *T. vivax*.

La técnica de PCR puede ser utilizada incluso en aquellos casos en los que existen infecciones mixtas con otros tripanosomas, ya que el uso de cebadores especie-específicos permite la diferenciación entre ellos. Si bien este método es más costoso, consume más tiempo y requiere un mayor nivel de experiencia técnica para su aplicación, su sensibilidad y especificidad son de gran utilidad y valor en el campo de la investigación, así como para un diagnóstico más seguro, permitiendo realizar un seguimiento y evaluación de los métodos de control del parásito y de la enfermedad que genera (Thumbi et al., 2008).

En países como Venezuela, Brasil y África, entre otros, existen diversos reportes en que se ha utilizado esta técnica para la detección, identificación, clasificación y control de *T. vivax* y otras especies de *Trypanosoma*, ya sea en sangre u otros tejidos, con excelentes resultados.

Los protocolos de amplificación utilizados han sido variables, adaptándose a las condiciones de cada laboratorio, pero efectivos en el diagnóstico por PCR de la tripanosomiasis por *T. vivax* (Morlais et al., 2001; Desquesnes y Dávila, 2002; Thumbi et al., 2008).

1.1.7. Tratamiento y control

El control de la tripanosomiasis depende en gran medida del control de los vectores del parásito y de la profilaxis con fármacos en el ganado. La interrupción del ciclo reproductivo de los insectos hematófagos involucrados, el uso de insecticidas, trampas para moscas y la aplicación de piretroides sintéticos en el ganado, permiten reducir las poblaciones de vectores del parásito (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

Pueden utilizarse drogas para la prevención y tratamiento de la tripanosomiasis, pero los tripanosomas pueden desarrollar rápidamente resistencia a las mismas, los costos son altos, y los resultados son insatisfactorios a largo plazo. Entre las drogas profilácticas y terapéuticas se encuentran los derivados de la fenantridina, como el bromuro y cloruro de homidío; el bromuro de piritidio (Protidium y AD2801) que puede dar protección por hasta seis meses, y el cloruro de isometamidio (Samorin, Trypamidium y M&B 4180A) que también es de las drogas preventivas más utilizadas y menos costosas. Otros fármacos utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis son el acetato de diminazina (Berenil), las naftilaminas sulfatadas (suramina), las aminoquinaleínas (sulfatode dimetil-quinapiramina), y los tripanocidas de amonios cuaternarios (Antrycide, Ethidium y Prothidium) (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

El uso de razas de ganado tripanotolerantes debe tomarse en cuenta, ya que ciertas razas de ganado son notoriamente más resistentes que otras; como por ejemplo, el ganado cornicorto y el ganado N'Dama (*Bos Taurus*), que son las razas de África Occidental más resistentes; por el contrario, el ganado Cebú (*Bos Indicus*), aunque es de mayor tamaño es más susceptible (Peña et al., 2000; Naessens, 2006; Cano, 2008).

Los mecanismos de tripanotolerancia han sido ampliamente estudiados y se ha establecido que tienen una base genética; constituyéndose principalmente por dos procesos que serían, la capacidad para controlar la parasitemia sin mediación de las células hematopoyéticas, linfocitos T o anticuerpos; y una mejor capacidad para no desarrollar anemia, mediada por las células hematopoyéticas; este último mecanismo es el más asociado con la ganancia de peso y la supervivencia. De esta forma, las razas (e individuos) resistentes, pueden tolerar la presencia de tripanosomátidos y controlar los niveles de parasitemia sin desarrollar una enfermedad severa que afecte de manera significativa sus niveles productivos (Peña et al., 2000; Naessens, 2006; Cano, 2008).

1.2 Justificación

1.2.1. Importancia

La tripanosomiasis causada por *T. vivax* presenta una sintomatología inespecífica que puede ser asociada con otras enfermedades como la babesiosis y anaplasmosis, de ahí, que en el pasado muchas infecciones pudieron no haber sido reportadas (Peña et al., 2000; Quispe et al., 2003; Oliveira et al., 2009; Cuglovici et al., 2010).

En Costa Rica se desconocía la presencia de *T. vivax*, hasta que en el año 2009, Oliveira y colaboradores publican un reporte en el que exponen la existencia de este parásito en la zona de Río Cuarto, en Alajuela. Sin embargo, a pesar de haber sido identificado, no se ha dado un seguimiento al parásito con el fin de confirmar su persistencia en el país. En las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica, las actividades agropecuarias desarrolladas generan excelentes condiciones para el establecimiento y propagación de esta hemoparasitosis. Es importante corroborar la permanencia de este parásito en el área, ya que tiene el potencial para afectar severamente la salud de los animales al generar principalmente, una anemia severa, en algunos casos acompañada de una profunda inmunosupresión, y consecuentemente un deterioro de la condición física y la salud en general, acarreando graves pérdidas económicas en el sector ganadero al disminuir la reproducción y la producción de leche o carne, así como la longevidad de los animales (Morlais et al., 2001; Uzcanga et al., 2004; Bolívar et al., 2006; García et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

El *T. vivax* es un patógeno potencialmente nocivo para los bovinos, y la enfermedad que provoca es de reporte obligatorio en el país. Por ello, debe tenerse en cuenta como una posible causa de enfermedad entre las explotaciones bovinas. Sin embargo, el diagnóstico por los medios parasitológicos más comunes como los frotis sanguíneos tiene una sensibilidad pobre, y los métodos serológicos de diagnóstico como el ELISA y la IFI, tienden a ser poco específicos y más costosos (Peña et al., 2000; Bolívar et al., 2006; Diario Oficial La Gaceta, 2008). El implementar un método de detección altamente sensible y específico como la PCR, permite dar un diagnóstico más seguro, con un mejor seguimiento del comportamiento del parásito dentro el hato, y a la vez, una evaluación a mediano y largo plazo de la efectividad o deficiencia en las medidas de control y los tratamientos instaurados.

1.2.2. Hipótesis

Hipótesis nula (H₀): El parásito *Trypanosoma vivax* está ausente en seis fincas de la Región Huetar Norte y Región Huetar Atlántica de Costa Rica.

Hipótesis alternativa (H₁): El parásito *Trypanosoma vivax* está presente en seis fincas de la Región Huetar Norte y Región Huetar Atlántica de Costa Rica.

1.3. Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos lecheros de seis fincas ganaderas de Región Huetar Norte y Región Huetar Atlántica de Costa Rica mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa.

1.3.2 Objetivos específicos

- Implementar el diagnóstico de *T. vivax* a través de la técnica del PCR en muestras de sangre total bovina.
- Determinar la presencia del parásito *T. vivax* en diferentes épocas del año, en bovinos lecheros de las fincas de la Región Huetar Norte y Región Huetar Atlántica de Costa Rica.
- Analizar las secuencias de las muestras positivas mediante la comparación con la base de datos global Gen Bank para confirmar la identificación y presencia de *T vivax*.

- Determinar el porcentaje de positividad e incidencia parcial de *T. vivax* para cada una de las fincas muestreadas de la Región Huetar Norte y Región Huetar Atlántica de Costa Rica.

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Sitio del muestreo:

Se eligieron las regiones Huetar Norte y Huetar Atlántica por selección intencional con base en el reporte anterior del parásito en la zona (Oliveira et al., 2009). Las fincas muestreadas fueron elegidas de manera aleatoria, una vez solicitada la aprobación de los propietarios para incluir su establecimiento en el proyecto.

Se realizaron visitas de campo a seis fincas, ubicadas en San Carlos, Río Cuarto y Venecia en Alajuela, de la Región Huetar Norte (Zona Norte) y una finca ubicada en Guápiles, en Limón, de la Región Huetar Atlántica (Caribe Norte) de Costa Rica. Por motivos de confidencialidad, dichos establecimientos fueron identificados por medio de numeración del uno al seis.

Las localidades mencionadas se encuentran ubicadas en terrenos extensos, con gran cantidad de precipitación y altas temperaturas; además de una época seca muy variable, la cual puede ser nula o abarcar varios meses (Castro y Treviño, 2006; Quesada, 2007).

Geográficamente, y según el sistema de clasificación de Holdridge, las fincas se encuentran dentro de las zonas de vida Bosque Muy Húmedo Tropical, Bosque Muy Húmedo Tropical Transición a Premontano, y Bosque Muy Húmedo Premontano Transición a Basal (Bolaños et al., 2005; Castro y Treviño, 2006; Quesada, 2007).

La distribución de las fincas se presenta a continuación:

- *En la Zona Caribe Norte (Región Atlántica):*

- Guápiles (Finca 1): se localiza en Pococí en la provincia de Limón. Según varios autores (Bolaños et al., 2005; Castro y Treviño, 2006; Quesada, 2007), el lugar pertenece a la Zona de vida, según la clasificación de Holdridge, Bosque muy húmedo tropical (bmh-T). Esta zona se encuentra en un piso altitudinal basal, con un potencial de evapotranspiración anual que va desde los 1414 mm a los 1650 mm; presentando un rango de precipitación pluvial que oscila entre 4000 y más de 6000 mm, como promedio anual, y una biotemperatura media anual que varía entre 24°C a 29°C.

Bolaños et al. (2005), Castro y Treviño (2006) y Quesada (2007) indican que en esta zona la humedad es variable, yendo desde el rango húmedo al perhúmedo, por lo que el período de menor pluviosidad es corto y ocurre durante febrero y marzo, de manera que los cultivos no resultan afectados; se puede decir que no existe una estación seca bien definida, si no periodos donde las lluvias disminuyen (los llamados veranillos), no habiendo meses secos (no hay déficit de agua en el suelo para las plantas). Para fines del uso de la tierra, este bioclima presenta algunas limitaciones por el exceso de precipitación durante la mayor parte del año, pues los terrenos son muy susceptibles a la erosión. No obstante, resultan muy atractivos para actividades forestales. Además de que en su condición natural inalterada, presentan gran biodiversidad, los bosques tropicales más exuberantes y los más altos se desarrollan en este bioclima.

- *En la Zona Norte (Región Huetar Norte):*

- Pital (Fincas 3 y 4): se localizan en San Carlos en la provincia de Alajuela.

Ambas pertenecen a la zona de vida, según la clasificación de Holdridge, Bosque muy húmedo Premontano, transición a Basal (bmh-P).

Según Bolaños et al. (2005) y, Castro y Treviño (2006) esta zona tiene una biotemperatura media anual entre 24°C y 27°C; el rango de precipitación anual varía de 2000 mm a 4000 mm, ubicando la zona en las provincias de humedad sub-húmeda a húmeda; con un potencial de evapotranspiración anual de 943 mm a 1414 mm. Es una condición intermedia entre el Bosque húmedo tropical (bh-T) y el Bosque muy húmedo tropical, transición a premontano (bmh-T). El período seco es también muy variable, dependiendo de la región en la cual se esté ubicado, pudiendo variar de cero hasta aproximadamente cinco meses efectivamente secos.

- Río Cuarto (Finca 2) y Venecia (Fincas 5 y 6): la primera se localiza en Grecia en la provincia de Alajuela. Las Fincas 5 y 6 se ubican en San Carlos, también en Alajuela.

Según Bolaños et al. (2005) y, Castro y Treviño (2006), estas localidades pertenecen a la zona de vida, según la clasificación de Holdridge, Bosque muy húmedo tropical, transición a Premontano (bmh-T). En esta región el rango de precipitación anual es de 4000 mm a 5500 mm, ubicándose en una zona húmeda, con un ámbito de biotemperatura anual que varía de los 20°C a 24°C. El potencial de evapotranspiración es de 1178 mm a 1414 mm anuales; con un período efectivamente seco que puede variar entre cero a tres y medio meses. En su estado inalterado, los bosques de este bioclima poseen una altura que varía entre 40 y 50 m., son bosques siempre verdes, donde las epífitas y lianas son abundantes. Esta zona bioclimática

corresponde a una franja angosta localizada en la zona de transición topográfica, donde el relieve pasa de ser muy quebrado a plano o casi plano.

2.1.2. Toma de la muestra

La toma de sangre se realizó durante los meses de mayo, junio, agosto, septiembre, octubre y noviembre en el año 2010. Estos periodos fueron determinados de manera no intencional, según lo permitieran los factores de logística y financiamiento. Se extrajo la sangre por punción en la vena coccígea de los animales del lote productivo de cada finca, sin distinción de raza o edad. Cada una de las muestras fue debidamente identificada con el número o nombre asignado en la finca, el nombre del establecimiento y la fecha de muestreo. Se conservó la sangre en tubos con EDTA, y posteriormente fue mantenida en congelación a -4°C, hasta su procesamiento en el laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional.

2.1.3. Extracción de ADN

Se trabajó con cada muestra individualmente, para ello, se utilizó el Kit comercial, Wizard Genomic DNA Purification Kit, siguiendo las especificaciones del fabricante. (Promega Corporation, Madison, WI, USA). El ADN extraído se almacenó a -20 °C.

*2.1.4. Diagnóstico molecular de *T. vivax* por medio de la PCR*

Una vez extraído el ADN presente en la sangre, se amplificó el fragmento de 173 pb de *T. vivax*, utilizando los cebadores **TVW-A**: (5GTG CTC CAT GTG CCA CGT TG'3') y **TVW-B**: (5'CAT ATG GTC TGG GAG CGG GT3') (Masiga et al., 1996; González et al., 2006).

La reacción de PCR se amplificó en un termociclador 2720 Thermal cycler. Tomando como referencia el procedimiento descrito en el artículo de Masiga et al. (1996), se utilizó un perfil de amplificación de 35 ciclos con las siguientes temperaturas: 94°C por un minuto, 63°C por un minuto y 72°C por un minuto, se incluyó un tiempo inicial de cinco minutos a 94°C para desnaturalización y una extensión final de 10 minutos a 72°C (Masiga et al., 1996; Luque y Herráez, 2001; Desquesnes y Dávila, 2002).

El análisis de los productos se efectuó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con Gel Red para su exposición bajo luz ultravioleta (Desquesnes y Dávila, 2002). Como marcador molecular se empleó el Gene Ruler™100 bp Plus DNA Ladder, de la casa comercial Fermentas®. Como control negativo se utilizó agua destilada estéril, y como control positivo se utilizó una muestra positiva de *T. vivax* aislada en Venezuela, dicho control fue donado por el Dr. Néstor Añez del Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Los Andes en Mérida, Venezuela.

2.1.5. Secuenciación y análisis de los resultados positivos

Una vez obtenidos los productos de la PCR en el gel de agarosa al 2%, se consideraron como muestras positivas, aquellas en las que estaba presente la banda de 173 pb asociada a *T. vivax*. Para analizar esta banda, se extrajo el fragmento de gel correspondiente, conteniendo la porción de ADN citada, para purificarla y secuenciarla utilizando los servicios del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Costa Rica.

Con el fin de confirmar la presencia de *T. vivax* en las muestras positivas, se utilizó el software BioEdit (Ibis Therapeutics, CA), para su edición, alineamiento y análisis, a fin de

corroborar los resultados obtenidos por la PCR convencional para el diagnóstico de *T. vivax*. Finalmente, las secuencias obtenidas se incluyeron individualmente en la base de datos internacional (GEN BANK).

2.1.6. Tipo de estudio y población a muestrear:

Se realizó un estudio descriptivo de tipo longitudinal prospectivo. Se muestreó a los animales que integraban los lotes productivos de las fincas visitadas, incluyendo individuos de diversas edades y razas. Tomando en cuenta la rotación normal del ganado en los establecimientos, la compra, venta, muerte o descarte de los animales, se procedió a muestrear el 100% de los individuos productivos presentes en cada finca en el momento de la visita. De ellos, fueron analizadas solo las muestras de los animales que estuvieron presentes en al menos dos de las visitas realizadas.

Todos los bovinos analizados pertenecían a las razas Holstein, Jersey, Pardo suizo, o sus cruces, es decir, se trata de ganado *Bos taurus*, el cual es más apto para la producción lechera. Prácticamente el 100% de los animales fueron hembras (solo existe un macho en el estudio), puesto que se muestrearon los lotes productivos de cada establecimiento lechero.

Una vez obtenidos los resultados de la PCR, se estimó el porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* en las poblaciones analizadas de cada finca. Este porcentaje de positividad (%P) fue calculado empleando la siguiente fórmula:

$$\%P = \frac{\text{Número total de individuos positivos en un tiempo dado}}{\text{Población total analizada en ese momento}} \times 100$$

La incidencia (I) es la medida de la proporción en que ocurren nuevos casos de una enfermedad o condición en una población previamente libre de ella, en un periodo de tiempo (Armitage y Berry, 1997). Cuando se calcula este valor a partir de una porción de una población inicial se trata de incidencia parcial. Para calcular la incidencia se empleó la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\text{Número de casos nuevos en un periodo de tiempo}}{\text{Población de riesgo}} \times 100$$

Las muestras procesadas se analizaron tomando en consideración la fecha del muestreo y la finca de la cual procedían, de manera que se logró un seguimiento de los individuos en los muestreos sucesivos. Los resultados positivos o negativos se clasificaron de forma que permitieran conocer la distribución del hemoparásito en las diferentes fincas analizadas, estableciendo el porcentaje de positividad y la incidencia parcial de *T. vivax* para cada una de las fincas muestreadas de la Región Huetar Norte y Región Huetar Atlántica de Costa Rica.

3. RESULTADOS

3.1. Población analizada

La cantidad de bovinos muestreados por finca fue variable durante el estudio; así, en la Finca 1 se sangraron 81 animales; en la Finca 2, 25 animales; en la Finca 3, 84 animales; en la Finca 4, 114 animales; en la Finca 5, 85 animales; y en la Finca 6, 67 animales. El Cuadro 1 muestra el número de individuos muestreados y analizados en cada finca. La población total analizada representa el 41,7% de la población muestreada durante el estudio.

Cuadro 1. Número de animales muestreados y analizados

Lugar de muestreo	Número de animales muestreados	Número de animales analizados
Finca 1	81	33
Finca 2	25	16
Finca 3	84	41
Finca 4	114	44
Finca 5	85	27
Finca 6	67	29
Total	456	190

De los 190 bovinos analizados en este estudio, resultaron positivos 150 animales, lo que representa un porcentaje de individuos positivos en general de 78.9%. Se toman como positivos aquellos de cuyas muestras fue posible obtener las secuencias que contenían el

fragmento de ADN de 173 pb, correspondiente con el protozooario *T. vivax* al ser comparadas con la base de datos global Gen Bank. Esta comparación mostró una homología del 98% con la secuencia *T. vivax* Y486, cromosoma 11; un 97% con la secuencia *T. vivax* Y486, cromosoma 1; y un 98% de homología con la secuencia de ADN satélite de *T. vivax* en la base de datos. A continuación se presenta la secuencia editada, asociada a dicho fragmento de ADN:

10	20	30	40	50	
GTGTGCTCCATGTGCCACGTTGGCACGCTCCACTGTCTACCGTGACGCGA					
51	60	70	80	90	100
TGGCCCGTGCACTGTCCCGCACCCCTTCCCCACTCCCTCTTGCACTTCTC					
101	110	120	130	140	150
GCTCCGGCCGTGCGCCTTCTTCAGGTTGGTGTCTGGTGGCCTGTTGGCCC					
151	160	170			
CCCACCCGCTCCAGACCATAT					

Figura 1. Secuencia del fragmento de 173 pb de *T. vivax*

El Cuadro 2 muestra el número de individuos positivos resultante en cada finca, así como en los diferentes periodos de muestreo una vez analizadas las muestras de ADN (Anexo 6.2). En la Finca 1 el tercer muestreo no se realizó, y para la Finca 3 el segundo muestreo tampoco se realizó; esto debido a dificultades al coordinar factores como el transporte, el financiamiento, los horarios del personal involucrado y la disponibilidad de los lugares de muestreo. Para la Finca 1 el primer muestreo correspondió al mes de mayo, el segundo al mes de setiembre, y el cuarto al mes de noviembre. Para las demás fincas el primer muestreo correspondió al mes de junio, el segundo al mes de setiembre (para la Finca 4 este muestreo fue en agosto), el tercero al mes de octubre, y el cuarto al mes de noviembre. El número total de individuos positivos en una finca, no corresponde a la suma de los valores reportados en

cada muestreo para ese establecimiento, ya que un mismo individuo puede resultar positivo en diferentes muestreos, pero al final del periodo de estudio cada bovino es contabilizado solo una vez, sin importar si ha sido positivo en una o en varias ocasiones.

Cuadro 2. Número de individuos positivos a *T. vivax* por finca en cada muestreo

Establecimiento	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo	Cuarto muestreo	Positivos durante todo el estudio
Finca 1	18	20	---	10	28
Finca 2	5	5	2	9	14
Finca 3	16	---	21	20	37
Finca 4	17	11	9	21	38
Finca 5	8	3	8	7	20
Finca 6	7	5	4	2	13

3.2. Estimación del porcentaje de positividad y la incidencia parcial de *T. vivax*

Se calcularon los porcentajes de individuos positivos a *T. vivax* en cada una de las fincas; y los valores de incidencia parcial en los casos en los que fue posible determinarla. El porcentaje de positividad general en cada finca, abarca todo el periodo de estudio, y no es el resultado de la suma de los valores calculados para cada muestreo. Esta diferencia radica en que un mismo individuo puede resultar positivo en distintos muestreos, pero será contabilizado solo una vez al estimar el porcentaje general de individuos positivos al final del estudio, sin importar si ha sido positivo en una o en varias ocasiones.

El Cuadro 3 muestra los porcentajes de positividad determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 1. El mayor porcentaje de individuos positivos fue de 66.7% en el mes de setiembre; el porcentaje más bajo fue de 52.6% en el mes de noviembre. Y al final del periodo de estudio, el porcentaje de positividad general obtenido para la Finca 1 fue de 84.8%.

Cuadro 3. Porcentaje de positividad de *T. vivax* en la Finca 1

Año 2010	Número de individuos analizados	Número de individuos positivos	Porcentaje de positividad
Mayo	29	18	62.1 %
Setiembre	30	20	66.7 %
Noviembre	19	10	52.6 %
Al final del estudio	33	28	84.8 %

En la Finca 1 no todos los animales comparten el mismo número de muestreos (Anexo 6.2.1), por lo cual, se calculó el valor de la incidencia parcial para los periodos comprendidos entre mayo y setiembre; y de setiembre a noviembre; utilizando sólo a los individuos en los que fue posible realizar un seguimiento durante estos periodos. El Cuadro 4 muestra los valores de incidencia parcial determinados mediante la técnica de la PCR para esta finca. Se aprecia que la incidencia parcial en el primer periodo, de mayo a setiembre, fue casi el doble, un 63.6%, que el valor obtenido en el periodo siguiente, un 33.3%, de setiembre a noviembre.

Cuadro 4. Incidencia parcial de *T. vivax* en la Finca 1

Año 2010	Individuos inicialmente negativos	Individuos que se volvieron positivos	Incidencia parcial
Mayo - Setiembre	11	7	63.6 %
Setiembre - Noviembre	3	1	33.3 %

El Cuadro 5 muestra los porcentajes de positividad determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 2. El mayor porcentaje de individuos positivos fue de 56.3% en el mes de noviembre; el porcentaje más bajo fue de 12.5% en el mes de octubre. Y al final del periodo de estudio, el porcentaje de positividad general obtenido para la Finca 2 fue de 87.5%.

Cuadro 5. Porcentaje de positividad de *T. vivax* en la Finca 2

Año 2010	Número de individuos analizados	Número de individuos positivos	Porcentaje de positividad
Junio	16	5	31.3 %
Setiembre	16	5	31.3 %
Octubre	16	2	12.5 %
Noviembre	16	9	56.3 %
Al final del estudio	16	14	87.5 %

El Cuadro 6 muestra los valores de incidencia parcial determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 2. Se determinaron tres periodos de tiempo durante el año 2010; el primero, de junio a setiembre; el segundo, de setiembre a octubre, en el que se presentó el valor más bajo de incidencia parcial para esta finca, un 18.2%; el tercer periodo, de octubre a noviembre, en el que se registró el valor más alto de incidencia parcial para este establecimiento, un 57.1%.

Cuadro 6. Incidencia parcial de *T. vivax* en la Finca 2

Año 2010	Individuos inicialmente negativos	Individuos que se volvieron positivos	Incidencia parcial
Junio - Setiembre	11	3	27.3 %
Setiembre - Octubre	11	2	18.2 %
Octubre - Noviembre	14	8	57.1 %

El Cuadro 7 muestra los porcentajes de positividad determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 3. El mayor porcentaje de individuos positivos fue de 51.2% en el mes de octubre; el porcentaje más bajo fue de 39% en el mes de junio. Y al final del periodo de estudio, el porcentaje de positividad general obtenido para la Finca 3 fue de 90.2%.

Cuadro 7. Porcentaje de positividad de *T. vivax* en la Finca 3

Año 2010	Número de individuos analizados	Número de individuos positivos	Porcentaje de positividad
Junio	41	16	39 %
Octubre	41	21	51.2 %
Noviembre	41	20	48.8 %
Al final del estudio	41	37	90.2 %

El Cuadro 8 muestra los valores de incidencia parcial determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 3. Se determinaron dos periodos de tiempo durante el año 2010; el primero, de junio a octubre; y el segundo, de octubre a noviembre. En estos periodos, los valores de incidencia parcial fueron muy similares, un 56% y un 55%, respectivamente.

Cuadro 8. Incidencia parcial de *T. vivax* en la Finca 3

Año 2010	Individuos inicialmente negativos	Individuos que se volvieron positivos	Incidencia parcial
Junio - Octubre	25	14	56 %
Octubre - Noviembre	20	11	55 %

El Cuadro 9 muestra los porcentajes de positividad determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 4. El mayor porcentaje de individuos positivos fue de 47.7% en el mes de noviembre; el porcentaje más bajo fue de 20.5% en el mes de octubre. Y al final del periodo de estudio, el porcentaje de positividad general obtenido para la Finca 4 fue de 86.4%.

Cuadro 9. Porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* en la Finca 4

Año 2010	Número de individuos analizados	Número de individuos positivos	Porcentaje de positividad
Junio	44	17	38.6 %
Agosto	44	11	25 %
Octubre	44	9	20.5 %
Noviembre	44	21	47.7 %
Al final del estudio	44	38	86.4 %

El Cuadro 10 muestra los valores de incidencia parcial determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 4. Se determinaron tres periodos de tiempo durante el año 2010; el primero de junio a agosto, en el que se presentó el valor más bajo de incidencia parcial para esta finca, un 22.2%; el segundo, de agosto a octubre; y el tercer periodo, de octubre a noviembre, en el que se registró el valor más alto de incidencia parcial para este establecimiento, un 42.9%.

Cuadro 10. Incidencia parcial de *T. vivax* en la Finca 4

Año 2010	Individuos inicialmente negativos	Individuos que se volvieron positivos	Incidencia parcial
Junio - Agosto	27	6	22.2 %
Agosto - Octubre	33	8	24.2 %
Octubre - Noviembre	35	15	42.9 %

El Cuadro 11 muestra los porcentajes de positividad determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 5. El mayor porcentaje de individuos positivos fue de 29.6% en los meses de junio y octubre; el porcentaje más bajo fue de 11.1% en el mes de septiembre. Y al final del periodo de estudio, el porcentaje de positividad general obtenido para la Finca 5 fue de 74%.

Cuadro 11. Porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* en la Finca 5

Año 2010	Número de individuos analizados	Número de individuos positivos	Porcentaje de positividad
Junio	27	8	29.6 %
Setiembre	27	3	11.1 %
Octubre	27	8	29.6 %
Noviembre	27	7	25.9%
Al final del estudio	27	20	74 %

El Cuadro 12 muestra los valores de incidencia parcial determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 5. Se determinaron tres periodos de tiempo durante el año 2010; el primero, de junio a setiembre, en el que se presentó el valor más bajo de incidencia parcial para esta finca, un 10.5%; el segundo, de setiembre a octubre, en el que se registró el valor más alto de incidencia parcial para este establecimiento, un 29.1%; y el tercer periodo, de octubre a noviembre.

Cuadro 12. Incidencia parcial de *T. vivax* en la Finca 5

Año 2010	Individuos inicialmente negativos	Individuos que se volvieron positivos	Incidencia parcial
Junio - Setiembre	19	2	10.5 %
Setiembre - Octubre	24	7	29.1 %
Octubre - Noviembre	19	5	26.3 %

El Cuadro 13 muestra los porcentajes de positividad determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 6. El mayor porcentaje de individuos positivos fue de 24.1% en el mes de junio; el porcentaje más bajo fue de 9% en el mes de noviembre. Y al final del periodo de estudio, el porcentaje de positividad general obtenido para la Finca 6 fue de 44.8%.

Cuadro 13. Porcentaje de positividad de *T. vivax* en la Finca 6

Año 2010	Número de individuos analizados	Número de individuos positivos	Porcentaje de positividad
Junio	29	7	24.1 %
Setiembre	28	5	17.9 %
Octubre	29	4	13.8 %
Noviembre	22	2	9 %
Al final del estudio	29	13	44.8 %

El Cuadro 14 muestra los valores de incidencia parcial determinados mediante la técnica de la PCR para la Finca 6. En este establecimiento no todos los animales tenían el mismo número de muestreos (Anexo 6.2.6), por lo cual, se calculó el valor de la incidencia parcial para los periodos comprendidos entre junio y setiembre; de setiembre a octubre; y de octubre al noviembre; utilizando solo a los individuos en los que fue posible realizar un seguimiento durante estos periodos. El valor más alto de incidencia parcial se registró en el primer periodo, de junio a setiembre, un 19%. Este dato disminuye gradualmente conforme avanza el tiempo, llegando a un valor de 5.3% en el tercer periodo, de octubre a noviembre.

Cuadro 14. Incidencia parcial de *T. vivax* en la Finca 6

Año 2010	Individuos inicialmente negativos	Individuos que se volvieron positivos	Incidencia parcial
Junio - Setiembre	21	4	19 %
Setiembre - Octubre	23	2	8.7 %
Octubre - Noviembre	19	1	5.3%

En el gráfico 1 se observan en conjunto, los datos correspondientes a las incidencias parciales de las fincas analizadas. Los establecimientos fueron muestreados en diferentes meses, por lo tanto, los periodos de tiempo en los que fue calculada la incidencia parcial varían de un establecimiento a otro, quedando de la siguiente manera:

- ♦ Para la Finca 1: el primer período corresponde a los meses de mayo a setiembre; el segundo periodo a los meses de setiembre a noviembre. No hay tercer periodo.

- ♦ Para la Finca 2: el primer periodo corresponde a los meses de junio a setiembre; el segundo de setiembre a octubre; y el tercer periodo abarca de octubre a noviembre.
- ♦ Para la Finca 3: el primer periodo corresponde a los meses de junio a octubre; el segundo de octubre a noviembre. No hay tercer periodo.
- ♦ Para la Finca 4: el primer periodo corresponde a los meses de junio a agosto; el segundo periodo los meses de agosto a octubre; y el tercer periodo de octubre a noviembre.
- ♦ Para la Finca 5 y la Finca 6: el primer periodo corresponde a los meses de junio a setiembre; el segundo de setiembre a octubre; y el tercer periodo de octubre a noviembre.

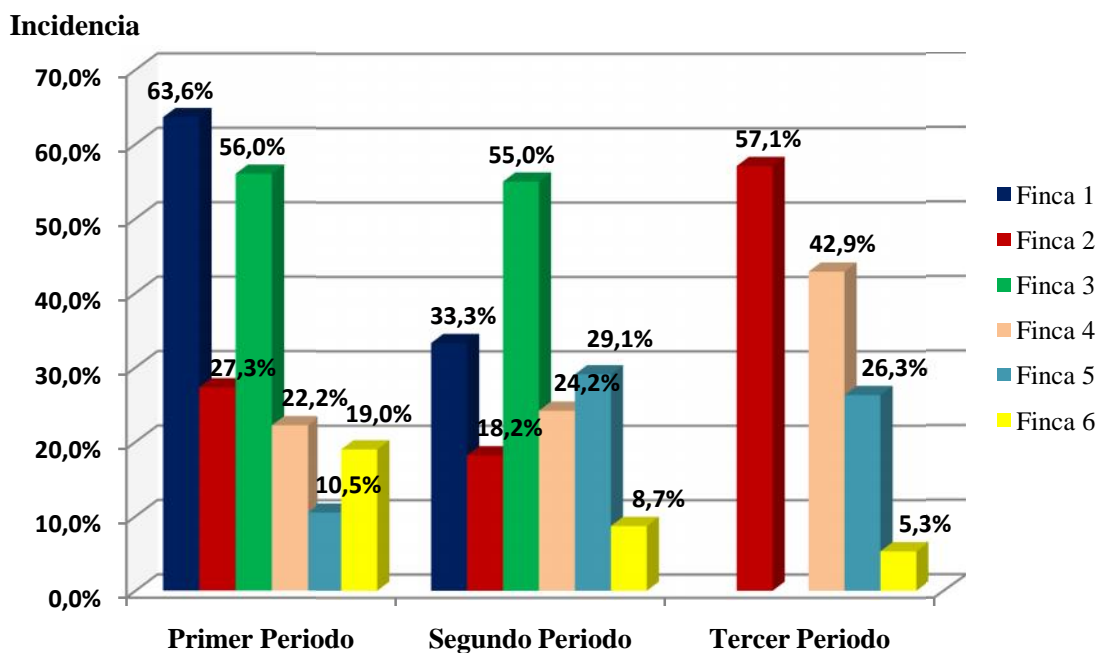


Gráfico 1. Incidencias parciales de *T. vivax* en las seis fincas analizadas

3.2.1. Distribución por edad de los individuos positivos a *T. vivax*

Los gráficos del 2 al 6 muestran los porcentajes de positividad según la edad de los bovinos, en las diferentes fincas a lo largo del periodo de estudio. Los datos de edad no se obtuvieron en la Finca 1, por lo cual no se incluyó un gráfico de la misma.

Los rangos de edad con un reducido número de individuos fueron unificados entre sí para formar grupos más homogéneos. En las fincas en las que no existían datos de registro de edades se toma como referencia el número de partos de cada animal.

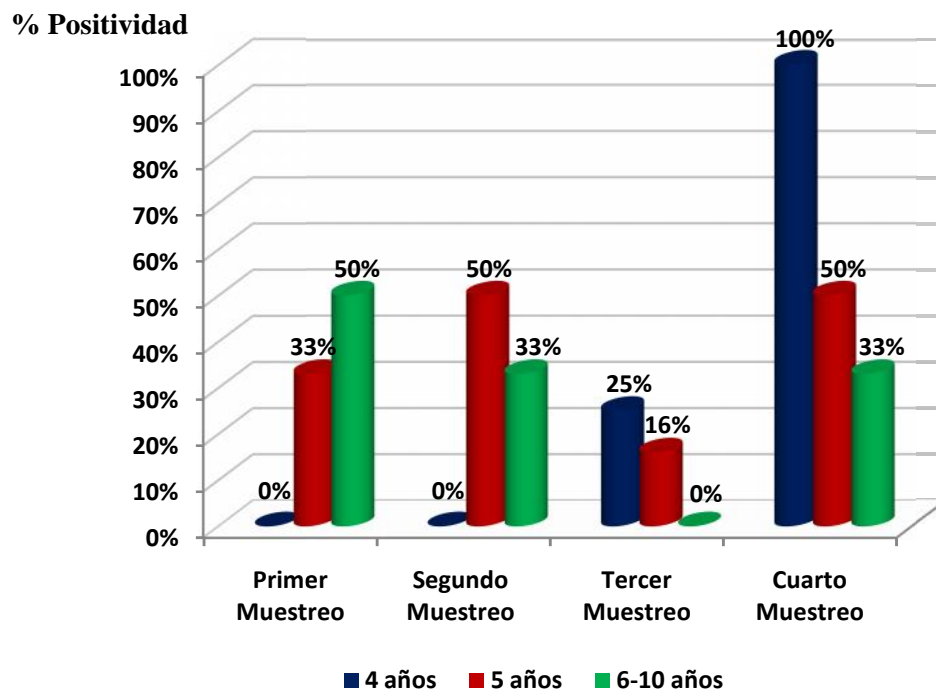


Gráfico 2. Porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* distribuidos según la edad en la Finca 2

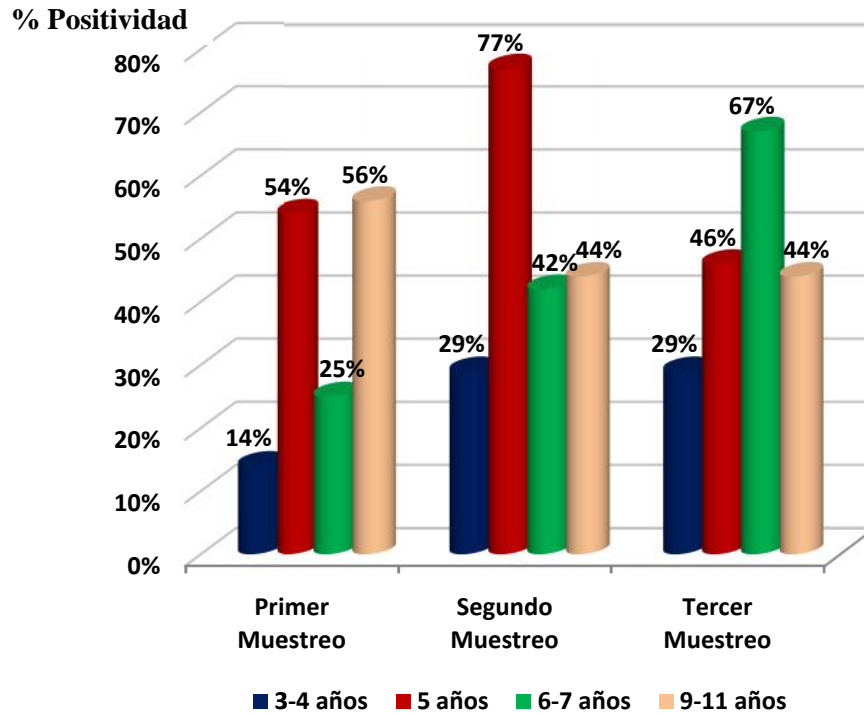


Gráfico 3. Porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* distribuidos según la edad en la Finca 3

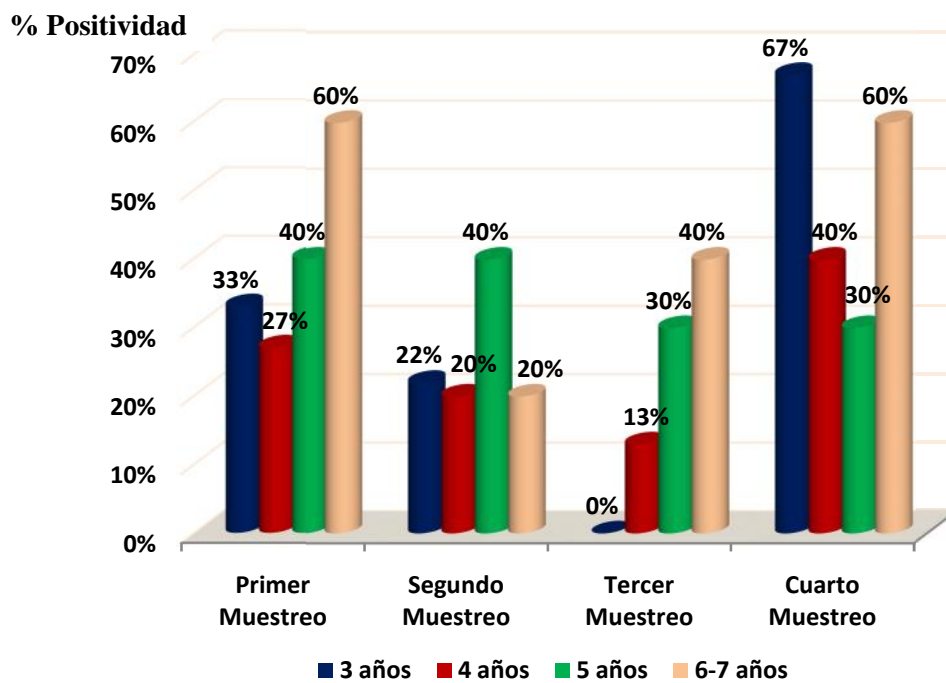


Gráfico 4. Porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* distribuidos según la edad en la Finca 4

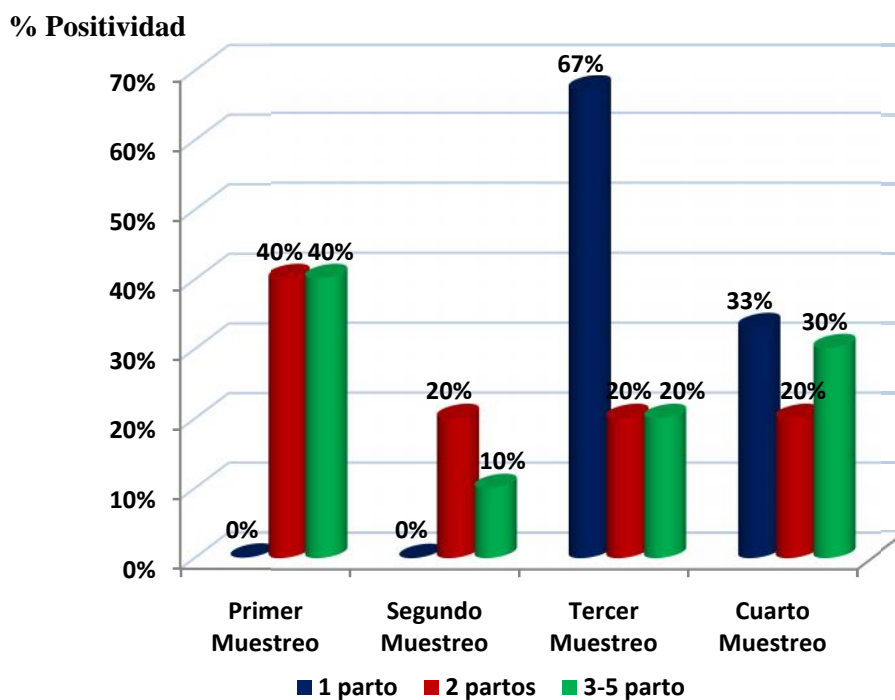


Gráfico 5. Porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* distribuidos según el número de partos en la Finca 5

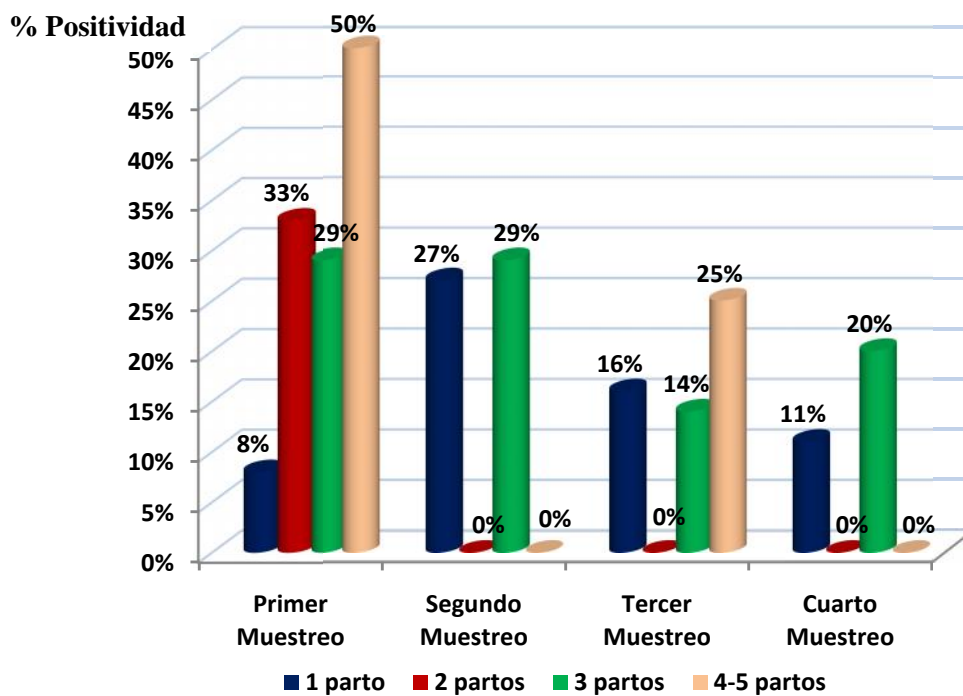


Gráfico 6. Porcentaje de individuos positivos a *T. vivax* distribuidos según el número de partos en la Finca 6

3.2.1. Distribución de los individuos positivos a *T. vivax* según la raza en la Finca 2

El gráfico 7 muestra los porcentajes de individuos positivos por raza para la Finca 2, durante el periodo de seis meses, de mayo a noviembre, en el año 2010. En este establecimiento se analizaron 16 animales, seis de ellos son de la raza Jersey, todos positivos; cinco son Holstein, de los cuales cuatro fueron positivos; y cinco bovinos son mestizos (chumecas), también con cuatro positivos, según los resultados obtenidos mediante la técnica de la PCR.

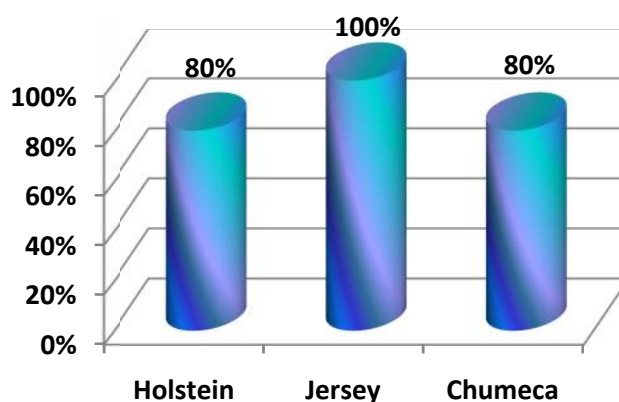


Gráfico 7. Porcentaje de individuos positivos por raza en la Finca 2

En las otras fincas no se realizó la distribución de los animales positivos a *T. vivax* según la raza, debido a que ninguna de ellas contaba con grupos de individuos de tamaño homogéneo al clasificarlos según su raza, o bien, el hato estaba enteramente formado por una misma raza de bovinos (Anexo 6.2). Por ello, no fue posible realizar una comparación adecuada entre las razas presentes en cada establecimiento lechero. Tampoco se realizó una comparación entre fincas, pues para ello, los animales deberían estar sometidos a las mismas condiciones, y obviamente cada local presentaba diferentes entornos y características.

4. DISCUSIÓN

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), resultó ser muy efectiva durante el estudio debido a su alta especificidad y sensibilidad, logrando la amplificación e identificación exitosas del fragmento de ADN de 173 pb correspondiente a *T. vivax*, revelando que el parásito se encuentra establecido en la zona y diseminándose exitosamente entre los animales, según el comportamiento reportado por otros autores para este tripanosoma, es capaz de evadir la respuesta inmunológica y se transmite con relativa facilidad por vía mecánica; de ahí, el alto número de individuos que constantemente recayeron en un estado positivo en los resultados obtenidos (Anexo 6.2) (Peña et al., 2000; Bolívar et al., 2006; Thumbi et al., 2008).

La secuenciación y comparación del ADN de *T. vivax*, permitieron la confirmación de los resultados en cuanto a la identidad del patógeno. Esto último, se vuelve necesario para un correcto diagnóstico, ya que, a pesar de que la técnica de PCR es un método de detección directo, amplifica junto con el ADN parasitario, ADN de tejidos y organismos presentes en la muestra. No obstante, aún siendo un método más complejo, es mucho menos limitado que las técnicas parasitológicas tradicionales en cuanto a la identificación específica, logrando resultados consistentes y confiables al trabajar con cantidades mínimas de material, permitiendo, por ejemplo, la amplificación de un pequeño segmento de ADN de 1 fg, si se conocen al menos 18-30 bases de las secuencias en sus extremos (Masiga et al., 1996; Luque y Herráez, 2001; Desquesnes y Dávila, 2002; Gasser, 2006).

Con los resultados obtenidos se hacen evidentes las excelentes condiciones presentes en el país para el asentamiento y diseminación de *T. vivax* entre las poblaciones ganaderas bovinas.

En la zona del estudio, las actividades agrícolas, el clima, las altas temperaturas y la geografía, representan factores ideales para el aumento en las poblaciones de insectos vectores del parásito (Castro y Treviño, 2006; García et al., 2009).

Estas condiciones ambientales de alta humedad y calor constante, con periodos secos variables también contribuyen con la creación de un entorno de vida más severo para el ganado, que exige y mengua la resistencia física de los bovinos, beneficia a los insectos vectores, y favorece el desarrollo y la transmisión de enfermedades, facilitando un medio ideal para albergar al *T. vivax*, permitiéndole establecerse y diseminarse entre las poblaciones de vectores y bovinos, siendo que las actividades humanas de la zona (ganadería y cultivo) también proporcionan los elementos necesarios para ello (Castro y Treviño, 2006; Quesada, 2007; García et al., 2009; Reisen, 2010).

Teniendo en cuenta el entorno mencionado, se puede considerar la utilidad de la técnica de PCR como herramienta diagnóstica, pese a ser más costosa y no ser infalible, es muy sensible y específica, lo que permite una alta detección de los parásitos a través del tiempo. Siendo útil como herramienta de vigilancia para las medidas de control en los sitios donde el parásito se ha establecido y, para la prevención de su diseminación a nuevos territorios (Bolívar et al., 2006; Gasser et al., 2006).

En el estudio, los resultados obtenidos por medio de la PCR revelaron rápidos incrementos en los porcentajes de positividad e incidencia parcial, reflejando la eficacia de *T. vivax* en cuanto a velocidad y facilidad de transmisión se refiere. Los altos valores de incidencia parcial reportados, indicaron un elevado riesgo de infección dentro de la población, no siendo raro que un mismo individuo se infectara repetidas veces (a pesar de haber vuelto a

un estado negativo) en el periodo de seis meses que duró el estudio. Se encontró que un elevado número de individuos llegó a infectarse durante ese periodo, por ello los porcentajes de positividad generales (al finalizar el estudio) fueron siempre mayores a los porcentajes obtenidos en cada muestreo en las respectivas fincas, estos últimos valores también fueron elevados, evidenciando el alto número de animales que fue parasitado. Esta diferencia entre los valores por muestreo y los obtenidos al final del estudio señalan la velocidad con la que el *T. vivax* se movía entre la población, ya que en cada muestreo los individuos positivos no fueron siempre los mismos (Anexo 6.2) y la gran cantidad de casos nuevos que surgieron con el tiempo eleva mucho la proporción de individuos infectados al final del estudio. Estas proporciones se encuentran a la par o son más elevadas que los valores de prevalencia existentes en otros países de Centroamérica, como lo son, Perú (5% al 22%); Venezuela (20.8% al 57.8%) y El Salvador (15%) (Quispe et al., 2003; Bolívar et al., 2006; Batista et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

Con los datos obtenidos por medio de la técnica de PCR, se realizó la estimación de los porcentajes de positividad de *T. vivax* en los hatos, obteniendo valores en extremo variables entre las diferentes fincas y los diferentes periodos. Así por ejemplo, en la zona de Guápiles, la Finca 1 contó con el mayor porcentaje de positividad en el segundo muestreo (setiembre), y mantuvo siempre valores elevados, que indicaron que más de la mitad del hato analizado fue positivo en cada uno de sus muestreos. Entre los meses de setiembre a noviembre, la incidencia parcial disminuyó a casi la mitad de los valores registrados anteriormente para esta finca, pero los altos porcentajes de positividad mantenidos indicaron la persistencia de *T. vivax* en aquellos individuos previamente infectados. En este establecimiento, un alto número de individuos fue eliminado en los meses finales del estudio (Anexo 6.2.1), lo cual puede afectar

la apreciación de los resultados al comparar dos periodos de tiempo, y al calcular la incidencia parcial (de ahí, la disminución en el valor de la misma), no obstante, los animales que permanecieron en el hato analizado continuaron infectados en una alta proporción, reafirmando que pese a la fuerte disminución en la cantidad de casos nuevos, un alto número de individuos ya infectados mantuvieron esta condición a través del tiempo. Esto puede ser favorecido por la capacidad de *T. vivax* para evadir el sistema inmunológico de los bovinos, que enfermos o no, pueden actuar como reservorios naturales y portadores subclínicos del parásito. Influyen también, las intensas condiciones ambientales del área, las cuales generaron un mayor estrés físico al ganado al someterlo a entornos más rigurosos y desgastantes durante el pastoreo (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al, 2000; Bolívar et al., 2006; Batista et al., 2009).

Sumado a esto, los controles de plagas fueron insuficientes y existía un estrecho contacto del ganado con las fuentes de insectos hematófagos, habiendo deficiencias serias en el manejo e identificación de los animales.

La pérdida de individuos no puede atribuirse únicamente al *T. vivax*, pero los descuidos en el manejo y los factores estresantes a los que se someten los animales, favorecen la manifestación clínica de esta tripanosomiasis y de las enfermedades en general (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al, 2000; Bolívar et al., 2006; Batista et al., 2009).

En la Finca 2, en Río Cuarto, el ganado se mantenía semiestabulado, con registros digitales de los animales, suplementación nutricional, buen manejo del hato, condiciones higiénicas apropiadas, y los bovinos se encontraron saludables en el transcurso de los seis meses del estudio. En los primeros muestreos, los porcentajes de positividad indicaron que

menos de la tercera parte del hato analizado estaba infectado por *T. vivax*, y para el mes de octubre estos valores disminuyeron aún más, de manera que una proporción importante de los individuos positivos al parásito pasó a un estado negativo según los resultados de la PCR. Esto se reflejó en los valores de incidencia parcial, que indicaron una reducción en el número de casos nuevos en la finca para este periodo de tiempo. Sin embargo, en el mes de noviembre se produjo un fuerte incremento tanto en los valores de incidencia parcial como en los porcentajes de individuos positivos, de manera que más de la mitad del hato llegó a estar infectado. Esto se relaciona con el aumento en las poblaciones de moscas y la eficiencia de estos vectores para transmitir al *T. vivax*, así como a la facilidad del parásito para moverse dentro de un hato en un corto periodo de tiempo (Ventura et al., 2001; Cuglovici et al., 2010).

Uno de los porcentajes de positividad más elevados se presenta en la Finca 3, en San Carlos. Este establecimiento contaba con registros digitales de los animales y su historia, las instalaciones físicas eran confortables para el ganado, se suplementaba la alimentación y el manejo en general era poco estresante física y mentalmente para los bovinos. Era evidente la estrecha cercanía con los campos de cultivo de piña, cuyos desechos generaban grandes poblaciones de moscas hematófagas que actuaban como vectores mecánicos para el *T. vivax* (Oliveira et al., 2009; Cuglovici et al., 2010).

Los altos porcentajes de positividad presentados indicaron que en la mayoría de los muestreos casi la mitad del hato analizado se mantuvo positivo; y los valores de incidencia parcial acotaron que en todos los periodos de tiempo, más de la mitad de los individuos negativos pasó a ser positivo para la infección con este tripanosoma; por ello, al final del

estudio se determinó que en esta finca, casi todo el hato analizado (90%) estuvo infectado en algún momento por el *T. vivax*.

Según los registros del lugar, la presentación de enfermedad clínica (ya sea por *T. vivax* u otras causas) era reducida en la finca, y durante la colecta de muestras no se observaron animales con sintomatología clínica compatible con la enfermedad causada por *T. vivax*. Esto puede verse influenciado por las condiciones de manejo y sanidad en el lugar, así como por la tripanotolerancia y la resistencia inmunológica a enfermedades propia de ciertas razas o individuos (Peña et al., 2000; Rojas-Montoya, 2004).

En la Finca 4 el hato se mantenía semiestabulado, utilizaban sistemas de ordeño mecánico, mantenían registros digitales del ganado, una organización responsable, muy buen manejo del hato, buenas condiciones de higiene, e intensos controles de plagas.

Durante los primeros meses del estudio, de junio a octubre, los porcentajes de individuos positivos fueron disminuyendo, pasando de una proporción que abarcaba más de la tercera parte del hato analizado como positivo en junio, a presentar menos de la cuarta parte de individuos positivos a *T. vivax* en octubre. Los valores de incidencia parcial en los periodos de junio a agosto, y de agosto a octubre, indicaron que menos de una cuarta parte de los individuos negativos se volvieron positivos, según los resultados de la PCR. Sin embargo, para el periodo comprendido entre los meses de octubre y noviembre, la situación cambia y la incidencia parcial se eleva, de manera que casi la mitad de los animales negativos se volvieron positivos, dando como resultado un fuerte aumento en los porcentajes de positividad, y casi la mitad de la población analizada resultó positiva en ese último mes; para el final del estudio,

más de tres cuartas partes de la población analizada fue positiva a *T. vivax* en este establecimiento.

Pese a los esfuerzos en los controles de plagas realizados en el lugar, la cercanía de las áreas de cultivo que rodeaban los sitios de pastoreo y estabulado, causaba frecuentemente que fueran afectados por los períodos de aumento en las poblaciones de insectos hematófagos que actúan como vectores transmisores del parásito, y son favorecidos por los cambios en el clima y las temporadas de cosechas. Aún así, la salud de los animales no se vio afectada (ya sea por *T. vivax*, u otras causas), el ganado recibía un buen soporte sanitario, suplementación de alimentos, y se minimizaba el estrés en los animales (Ventura et al., 2001; Oliveira et al., 2009; Cuglovici et al., 2010).

En las Fincas 5 y 6, se presentaron los menores porcentajes de individuos positivos durante el estudio. Estos establecimientos contaban con deficiencias en la organización, el manejo, los controles de salud y de plagas en las primeras visitas. No obstante, durante el periodo de estudio ambos lugares realizaron cambios en dichos factores, mejorando progresivamente las condiciones higiénicas, y los controles de moscas. Mantenían su ganado estabulado, dándoles un mayor control sobre las condiciones y factores que afectaban la salud de los animales. El efecto de estas acciones se aprecia en la disminución constante de los porcentajes de positividad e incidencia parcial en la Finca 6; y en la estabilización de estos valores en la Finca 5.

En la Finca 5 los porcentajes de positividad se incrementaron levemente a través del tiempo, y en ninguno de los muestreos realizados el número de animales positivos a *T. vivax* fue superior a un tercio de la población analizada. La incidencia parcial presenta un patrón

similar, en el periodo de junio a setiembre la décima parte de los animales negativos en el hato analizado pasó a ser positiva; de setiembre a octubre, y de octubre a noviembre, la incidencia parcial fue mayor pero, en ambos periodos, menos de la tercera parte de los animales negativos se volvió positiva, según los resultados de la PCR. Aunque existieron aumentos en la cantidad de animales positivos, estos fueron más leves en comparación con las otras fincas, siendo obvio que los cambios realizados en las medidas de higiene, manejo y control de moscas fueron determinantes en el control de la transmisión de *T. vivax* (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

En la Finca 6, en todos los muestreos, la cantidad de individuos positivos fue inferior a la cuarta parte de la población analizada. Los porcentajes de positividad y los valores de incidencia parcial disminuyeron conforme avanzaba el tiempo, siendo que cada vez era menor el número de individuos positivos y casos nuevos en el hato analizado. En esta finca, la estabulación de los animales, junto con el control de las moscas hematófagas, las mejoras en el manejo, y el descarte de individuos débiles, enfermos o poco productivos, han permitido disminuir exitosamente la infección por el *T. vivax*, convirtiéndose en un ejemplo de control exitoso, pese a que se encontraban expuestos a los mismos escenarios ambientales, climáticos y de entorno propicios para la infección del parásito que los otros establecimientos (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

En general, a lo largo del período de seis meses, los aumentos y reducciones en los porcentajes de positividad e incidencia parcial en las diferentes fincas se presentaron en distintos momentos para cada establecimiento, y mientras una finca mostraba porcentajes bajos de positividad en un determinado mes, otra finca del área mostraba altos porcentajes

para ese mismo momento. En todos los establecimientos (exceptuando a la Finca 6) existía una elevación y disminución constante de los valores de positividad e incidencia parcial conforme avanzaba el tiempo, indicando períodos en los que aumentó o disminuyó la transmisión de *T. vivax* dentro de los hatos; estos períodos de elevación en el número de individuos positivos fueron relacionados principalmente con el crecimiento en las poblaciones de vectores hematófagos y los periodos de estrés físico, que pudieron generar en los animales mayor susceptibilidad a contraer enfermedades. No se evidenció una fuerte correlación entre los porcentajes de positividad y la época del año o la estación climática; más bien, cuando las condiciones ambientales del lugar y los periodos de cosecha beneficiaban al parásito y sus vectores, se observaron incrementos en los porcentajes de positividad del parásito entre los bovinos de las Fincas 2 y 4, que son cercanas a los cultivos; indicando que el tamaño y la cercanía de las poblaciones de insectos hematófagos, así como las medidas de control de plagas tomadas en cada lugar son determinantes al controlar la propagación de la infección por *T. vivax* en el ganado (Ventura et al., 2001; Cortez et al., 2009; Cuglovici et al., 2010).

Las buenas prácticas de manejo en las fincas, enfocadas a evitar la transmisión iatrogénica de enfermedades, a proporcionar una adecuada alimentación, niveles reducidos de estrés ambiental, nutricional, físico y mental, y buenos controles de sanidad e higiene, también son factores influyentes en la salud de los animales y la manifestación clínica de enfermedades, y por ende, en la transmisión de *T. vivax* y la aparición de la enfermedad que provoca. De tal manera, un animal que se encuentre saludable y en un ambiente confortable puede resultar positivo al parásito, pero esto no implica el desarrollo de la enfermedad clínica, pudiendo permanecer solo en un estado de portador por un periodo indefinido, ya que los bovinos son

reservorios activos del parásito (Peña et al., 2000; Jones y Dávila, 2001; Rodríguez-Vivas et al., 2003; Bolívar et al., 2009; Cuglovici et al., 2010).

La persistencia de *T. vivax* fue beneficiada también por el comportamiento del parásito en el huésped, al cambiar su recubrimiento glicoproteico para evadir al sistema inmune del animal, generando una infección persistente en un ciclo continuo de replicación de *T. vivax*, producción de anticuerpos, desarrollo de complejos inmunes y cambio en las glicoproteínas de superficie (Peña et al., 2000; Uzcanga et al., 2004). De esta forma, se obtuvieron individuos reinfectados, que a pesar de haber sido encontrados como negativos para la infección, volvieron a un estado positivo después de uno o dos periodos de muestreo, tal como lo demostraron los resultados del PCR (Anexo 6.2). Sin duda, esta particularidad del parásito influyó en los altos porcentajes de positividad e incidencia parcial reportados, y no dejó de confirmar la facilidad y rapidez con las que el *T. vivax* se movía entre la población de bovinos.

Existen además, factores como la raza o la edad de los individuos que pueden influir en la susceptibilidad que presentan contra infecciones o enfermedades (Peña et al., 2000; Rojas-Montoya, 2004). Así por ejemplo, en la Finca 2, los animales más jóvenes fueron los que presentaron porcentajes de positividad más altos dentro del hato analizado. Los animales de edad media y los más viejos, mantuvieron porcentajes de positividad más bajos y con valores similares entre sí en los diferentes muestreos. La infección por *T. vivax* persistió a través del tiempo, sin que hubieran grandes reducciones en la cantidad de animales positivos, y en esta finca un alto número de bovinos fueron detectados como positivos desde una temprana edad, siendo probable que mantengan esa condición latente a lo largo de su vida productiva, y que

esto influya negativamente en su rendimiento si la infección se activa en algún momento (Bolívar et al., 2006).

En la Finca 3, fueron los animales viejos y de mediana edad los que mostraron los valores más elevados de positividad. Aún así, estos porcentajes aumentaron en todas las edades conforme avanzaba el tiempo, de manera que casi todo el hato resultó infectado en este establecimiento. En la Finca 4, fueron los animales más jóvenes y los más viejos, los que mostraron las proporciones más altas de individuos positivos, mientras que los individuos de mediana edad mantuvieron porcentajes de positividad similares entre sí a lo largo del estudio.

En la Finca 5 los animales de menor edad presentaron los valores más elevados de individuos positivos. Para los animales de mediana edad y viejos, las proporciones se mantienen similares en los diferentes muestreos. Lo contrario ocurre en la Finca 6, donde los animales más viejos presentaron los mayores porcentajes de positividad, seguidos por los animales de edad media, y finalmente los animales más jóvenes, con la menor cantidad de individuos positivos. En esta finca el número de bovinos positivos a *T. vivax* en todas las edades fue disminuyendo conforme avanzaba el tiempo, llegando a ser nulo en ocasiones, lo que reafirma la posibilidad de controlar e incluso erradicar la presencia del parásito en el hato, si se toman las medidas adecuadas de control.

Los resultados obtenidos al calcular los porcentajes de positividad, utilizando grupos de individuos clasificados según su edad en las diferentes fincas, revelaron que la infección puede estar presente en sujetos de cualquier edad; de manera que los animales en un rango de edad de cuatro a siete años (la gran mayoría) fueron los que con más frecuencia presentaron altos porcentajes de individuos positivos a lo largo del tiempo. Los grupos con animales más

jóvenes (alrededor de tres años) y más viejos (más de nueve años), alcanzaron los valores más elevados del estudio en ciertos periodos, es decir, entre ellos se determinó como positivos a una mayor cantidad de individuos, posiblemente por tratarse de las poblaciones más susceptibles, inmunológicamente hablando (Peña et al., 2000; Rojas-Montoya, 2004).

En cuanto a la raza de los animales, no se pudo determinar como un factor de resistencia o susceptibilidad para la infección en este estudio, ya que, aunque en la Finca 2 existían diferencias entre las proporciones de animales positivos por raza, no se trataba de valores tan distantes al comparar los resultados obtenidos entre los bovinos de este establecimiento. Tampoco fue posible realizar una comparación entre fincas, debido a que las condiciones de manejo, sanitarias y de estrés fisiológico y ambiental, son factores decisivos para la positividad por *T. vivax*, y las enormes variantes entre los establecimientos no permitieron realizar una comparación adecuada.

La Finca 2 se tomó como ejemplo, ya que solo en este establecimiento existían proporciones similares en el número de animales pertenecientes a cada una de las razas que poseen, esto es, Holstein, Jersey y su cruce (Chumeca). Se observó que todas las vacas de raza Jersey fueron positivas a la infección, sin embargo, esto no puede asegurar la susceptibilidad a la infección como un hecho general para la raza, ya que sería necesario analizar otras poblaciones, que logren mantener proporciones adecuadas en el número de individuos pertenecientes a cada raza, antes de obtener un resultado más certero. Otros estudios han demostrado la existencia de tripanotolerancia o susceptibilidad, por influencia genética en ciertas razas, a la manifestación de la enfermedad causada por *T. vivax* (Navarrete y Acosta, 1999; Peña et al., 2000).

4.1. Conclusiones

1. Se implementó exitosamente la técnica de la PCR para el diagnóstico de la infección por *T. vivax* en muestras de sangre total bovina, determinando su presencia y persistencia en los hatos de las seis fincas ganaderas ubicadas en la Región Huetar Norte y la Región Huetar Atlántica de Costa Rica.
2. Se determinó la presencia de *T. vivax* en los bovinos, detectando un porcentaje de positividad del 78.9% e incidencias parciales entre el 5.3% y 63.6% en cada uno de los meses de muestreo, alcanzando altos porcentajes en cualquier época del año.
3. Se analizaron los productos de la PCR mediante secuenciación encontrándose un 98% de homología por medio de la comparación de las secuencias que contenían el fragmento de 173 pb con los registros globales del Gen Bank, corroborándolas como secuencias propias de *T. vivax*.
4. Se determinaron los porcentajes de positividad e incidencia parcial de *T. vivax* para cada una de las fincas muestreadas, ubicadas en la Región Huetar Norte y la Región Huetar Atlántica del país.

4.2. Recomendaciones

1. Se recomienda utilizar la prueba de PCR para el diagnóstico de *T. vivax* ya que se demostró su utilidad en detectar la infección en un alto porcentaje de animales y podría ser empleada en investigación y vigilancia epidemiológica de esta parasitosis de reporte obligatorio en nuestro país.

2. La PCR permite la detección del parásito sin importar si la parasitemia es alta o baja, si no hay sintomatología clínica, o ha pasado un tiempo relativamente largo desde la toma de la muestra. Es un método de diagnóstico muy seguro, de manera que muestreos periódicos permitirían evaluar si los tratamientos y medidas de control establecidas resultan efectivos.
3. Se recomienda el desarrollo de otras investigaciones con el fin de analizar el impacto económico y sobre la salud de los animales que podría ejercer la presencia de *T. vivax*.
4. Es importante investigar los factores implicados en el mantenimiento del ciclo de transmisión de esta parasitosis para poder implementar medidas de control y prevención de la infección.
5. Se debe determinar el nivel de parasitemia presente en los bovinos y correlacionarlo con el estado de salud y productividad de los animales infectados para determinar el impacto económico.
6. Se recomienda la prueba de PCR para la detección de individuos asintomáticos que son fuente de infección para otros animales sanos. El rendimiento general de los animales enfermos con tripanosomiasis por *T. vivax* se ve muy deteriorado debido a la reducción de la vida útil e índices productivos de los animales. Los individuos asintomáticos sirven de reservorio al parásito y fuentes de contagio (a través de los vectores) para los animales negativos, manteniendo la presencia del parásito en el hato. Por ello, es necesario establecer medidas adecuadas para el control de *T. vivax*, por medio de la implementación de programas de salud de hato más eficientes, que fomenten el desarrollo de buenas prácticas de manejo, altos estándares sanitarios, y controles veterinarios regulares con el fin de

mantener una vigilancia constante que permita conocer la presencia de patógenos infecciosos dentro de los hatos.

7. En el caso de *T. vivax*, es de gran ventaja para reducir su impacto negativo en las producciones ganaderas, la selección y crianza de los individuos más resistentes, así como la utilización de razas tripanotolerantes.
8. En la medida de lo posible, el descarte de los animales positivos al parásito permite acelerar la reducción de los índices de infección dentro de los hatos, siempre que se combine estas acciones con un intenso e indispensable control de los vectores hematófagos, así como la regulación de las prácticas agropecuarias involucradas en la reproducción de los insectos.
9. Se debe fomentar una mayor conciencia en cuanto al uso y aprovechamiento de la tierra, promoviendo una mejor delimitación y mayor separación entre las áreas de cultivo y las ganaderas, siendo pertinente que las primeras hagan una disposición más responsable de sus desechos, con el objetivo de romper o al menos entorpecer el ciclo reproductivo de los insectos hematófagos (principales vectores de transmisión).

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armitage, P. & G. Berry. 1997. Estadística para la investigación biomédica. 3^{era} Edición. España: Harcourt.
- Batista, J., A. Oliveira, C. Rodrigues, C. Damasceno, I. Oliveira, H. Alves, E. Paiva, P. Brito, J. Medeiros, A. Rodrigues & M. Teixeira. 2009. Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheeps in the Brazilian semiarid region: from acute disease outbreak to chronic cryptic infection. *Vet. Parasitol.* 165: 131-135.
- Bezerra, F., H. Garcia, H. Alves, I. Oliveira, A. Silva, M. Teixeira & J. Batista. 2008. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimario de ovinos experimentalmente infectados. *Pesq. Vet. Bras.* 28: 575-582.
- Bolívar, A., P. García-Lugo, G. Crisante, A. Rojas, M. MGTeixeira & N. Añez. 2006. Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* 46: 87-90.
- Cortez, A. A. Rodrigues, H. García, L. Neves, J. Batista, Z. Bengaly, F. Paiva & M. Teixeira. 2009. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America – characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol. Cell. Prob.* 23: 44-51.
- Cuglovici, D., D. Bartholomeu, J. Reis-Cunha, A. Carvalho & M. Ribeiro. 2010. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 169: 320-326.
- Desquesnes, M. & A. Dávila. 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.* 109: 213-231.

- Evans, V. 1983. Estudio y diagnóstico de tripanosomiasis bovina en Costa Rica. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional. Costa Rica.
- García, H., A. Rangel-Rivas, I. Contreras, M. García, F. García & T. Perrone. 2009. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, Estado Apure, Venezuela. *Rev. Cientif.* 19: 230-237.
- Gasser, R. 2006. Molecular tools-advances, opportunities and prospects. *Vet. Parasitol.* 136: 67-89.
- Gómez-Piñeres, E., L. Tavares-Marques, & A. Reyna-Bello. 2009. Tiempo de supervivencia *in vivo* y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Cientif.* 19: 225-229.
- González, J., A. Loza & E. Chacón. 2006. Sensitivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. *Vet. Parasitol* 136: 119-126.
- Jones, T. & A. Dávila. 2001. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Trends Parasitol.* 17: 99-101.
- Luque, J & A. Herráez. 2001. *Biología molecular e ingeniería genética*. 1^{era} Edición. España: Harcourt.
- Masiga, D., J. McNamara, C. Laveissière, P. Truc, W. Gibson. 1996. A high prevalence of mixed trypanosome infections in tsetse flies in Sifra, Côte d' Ivore, detected by DNA amplification. *Parasitol.* 112, 75-80.

- Morlais, I., S. Ravel, P. Grébaud, V. Dumas & G. Cuny. 2001. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Tropica*. 80: 207-213
- Navarrete, I. & I. Acosta. 1999. Tripanosomosis. p. 302-309 *In* Cordero del Campillo M. et al. *Parasitología veterinaria*. 3 reimp. España: Mc Graw-Hill-Interamericana.
- Oliveira, J., J. Hernández-Gamboa, C. Jiménez Alfaro, R. Zeledón, M. Blandón & A. Urbina. 2009. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. *Vet. Parasitol.*163: 136-139.
- Quispe, P., A. Chávez, E. Casas, A. Trigueros & F. Suárez. 2003. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de la provincia de Coronel Portillo, Ucayali. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 14: 161-165.
- Reisen, W. 2010. Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu. Rev. Entomol.* 55: 461-83.
- Rodríguez-Vivas, R., F. Quiñones-Avila, G. Ramírez-Cruz, H. Ruiz-Piña. 2003. Presencia del género *Trypanosoma* en la garrapata *Boophilus microplus* en el trópico mexicano. *Rev. Biomed.* 14: 29-33.
- Thumbi, S., F. McOdimba, R. Mosi & J. Jung'a. 2008. Comparative evaluation of three PCR base diagnostic assays for the detection of pathogenic trypanosomes in cattle blood. *Parasit. Vect.* 1: 46.
- Uzcanga, G., T. Perrone, J. Noda, J. Pérez-Pazos, R. Medina, J. Hoebeke & J. Bubis. 2004. Variant surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochem.* 43: 595-606.

Ventura, R., F. Paiva, R. Silva, G. Takeda, G. Buck & M. Teixeira. 2001. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp. Parasitol.* 99: 37-48.

5.1. Referencias electrónicas

Bolaños R., V. Watson & J. Tosi. 2005. Mapa Ecológico de Costa Rica (Zonas de Vida), según el sistema de clasificación de zonas de vida del mundo de L.R. Holdridge. Escala 1: 750 000 [en línea] CCT, Costa Rica <<http://www.cct.or.cr/mapas/zonas-de-vida-costa-rica.pdf>> (Consulta: 20 Oct, 2012).

Cano, J. 2008. Aplicación de los sistemas de información geográfica al estudio de la transmisión de la tripanosomiasis africana en los focos de Kogo y Mbini, Guinea Ecuatorial. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid. España <<http://eprints.ucm.es/8239/1/T30591.pdf>> (Consulta 19 Jun, 2014).

Castro, S. & M. Treviño. 2006. Módulos validados [en línea] ZIR-SEE, Costa Rica. <<http://www.sirzee.itcr.ac.cr/modules/INDICADORES/documentos/MODULOS%20VALIDADOS.pdf>> (Consulta: 30 Nov, 2012).

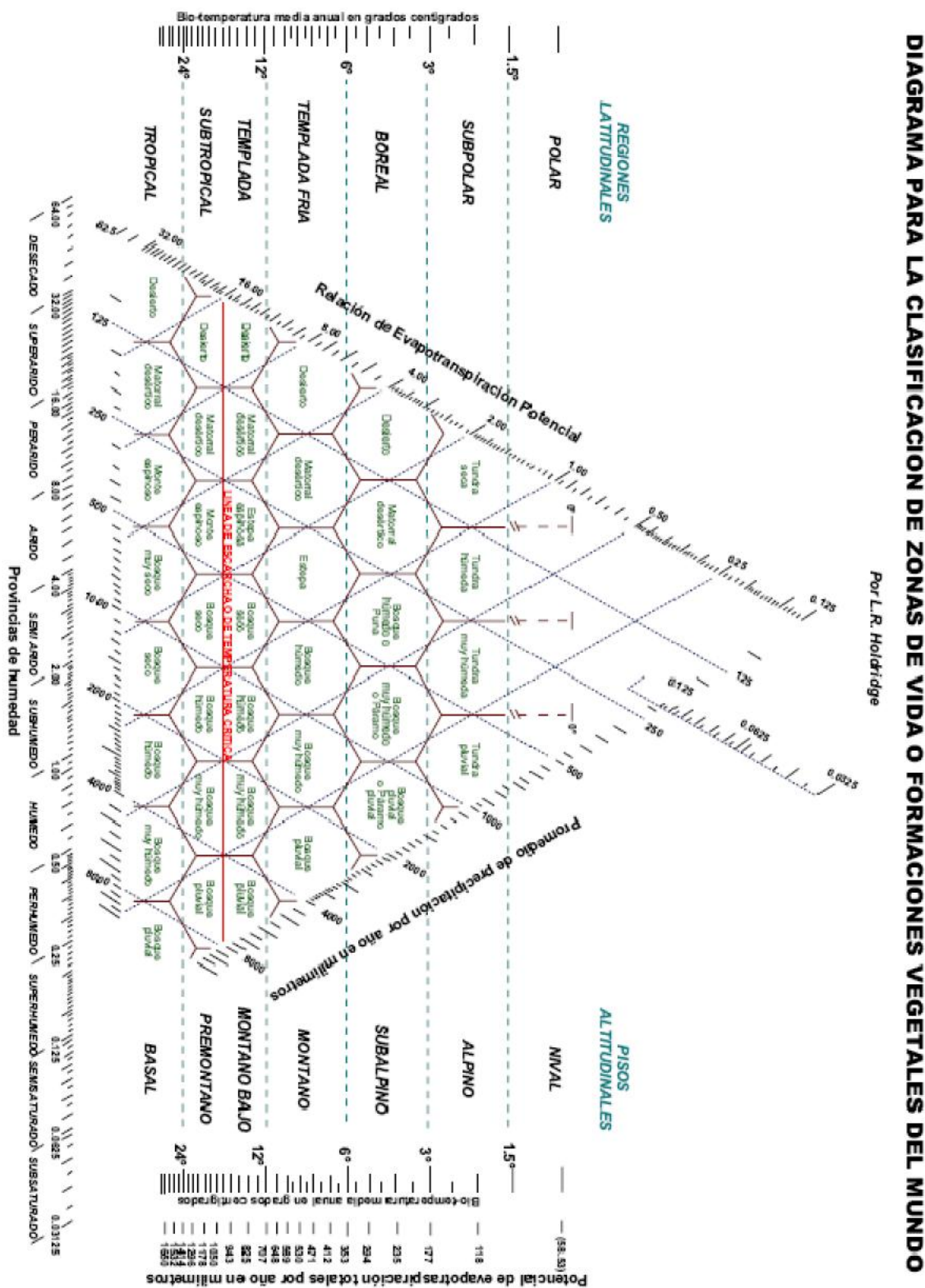
Decreto 34 669-MAG. Listado de enfermedades animales de declaración obligatoria. [en línea] 2008. Diario Oficial La Gaceta. N° 156: 3-5. Ago.13. <http://www.gaceta.go.cr/pub/2008/08/13/comp_13_08_2008.pdf> (Consulta 13 Mar, 2014)

García, F., C. Suárez & G. Baldizán. 2001. Revisión de las alteraciones de la coagulación sanguínea en la tripanosomiasis animal, con especial referencia al *Trypanosoma vivax* [en línea] *Rev. Fac. Cs. Vets.* 42: 109-124. <<http://bibliofcv.veter.ucv.ve/revistafcv/pdf/garc%C3%ADaf.pdf>> (Consulta: 19 Jun, 2014).

- Naessens, J. 2006. Bovine trypanotolerance: a natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome [en línea] *Int. J. Parasitol.* 36: 521-528. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751906000695>> (Consulta 19 Jun, 2014).
- Peña, G., B. Fierros & A. Mateos (eds). 2000. Enfermedades exóticas de los animales [en línea] IICA, México <<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/Exoticas.pdf>> (Consulta: 7 Feb, 2012).
- Quesada, R. 2007. Los bosques de Costa Rica. [en línea] Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica <<http://www.asvocr.org/pdfs/bosquedecostarica.pdf>> (Consulta: 24 Jul, 2013).
- Rojas-Montoya, W. (2004). Inmunidad innata o natural [en línea]: Factores constitutivos. p. 56-57. *In* *Inmunología*. 13 ed. Cap. V. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. <<http://books.google.com.co/books?id=EXzRE9PYkQC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>> (Consulta: 13 Dic, 2013).
- Suárez, C., F. García, G. Baldizán & F. Mujica. 2003. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax* [en línea] *Vet. Trop.* 28: 79-92. <[http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas ci/VeterinariaTropical/vt2801/arti/suarez_c.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas%20ci/VeterinariaTropical/vt2801/arti/suarez_c.htm)> (Consulta: 19 Jun, 2014)

6. ANEXOS

Anexo 6.1.1. Diagrama para la clasificación de las Zonas de Vida



Anexo 6.2.1. Individuos positivos a T. vivax en la Finca 1.

Muestra		Resultado PCR		
Individuos (Hembras)		Muestreos		
Identificación	Raza	25 Mayo	22 Setiembre	16 Noviembre
10	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
12	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
19	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
22	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
27	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
54	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
60	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
68	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
73	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
81	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
Cacho de Aguja	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
13	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	-	POSITIVO
18	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	-	POSITIVO
20	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	POSITIVO	-
21	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
24	Cruce Pardo Suizo	-	POSITIVO	POSITIVO
30	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	-	POSITIVO
37	Cruce Pardo Suizo	-	POSITIVO	NEGATIVO
67	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	POSITIVO	-
83	Cruce Pardo Suizo	-	NEGATIVO	NEGATIVO
90	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	NEGATIVO	-
353	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	-
Abuela	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	NEGATIVO	-
Coneja	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	NEGATIVO	-
Enrique	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	NEGATIVO	-
Fantasma	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	POSITIVO	-
Gabarros	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	NEGATIVO	-
Guapileña	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	-
Inútil	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	POSITIVO	-
Jorobada	Cruce Pardo Suizo	NEGATIVO	NEGATIVO	-
Manfred	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	NEGATIVO	-
Panza Blanca	Cruce Pardo Suizo	POSITIVO	POSITIVO	-
Toro	Cruce Pardo Suizo	-	POSITIVO	NEGATIVO

Nota: todos los individuos son hembras, a excepción obviamente de Toro.

Anexo 6.2.2. Individuos positivos a T. vivax en la Finca 2.

Muestra			Resultado PCR			
Individuos (Hembras)			Muestras			
Identificación	Raza	Edad	22 Junio	01 Setiembre	23 Octubre	25 Noviembre
14	Chumeca	10 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
25	Chumeca	10 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
26	Jersey	8 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
28	Chumeca	7 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
29	Jersey	6 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
35	Holstein	5 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
36	Holstein	5 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
38	Holstein	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
41	Holstein	5 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
42	Holstein	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
45	Chumeca	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
47	Chumeca	5 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
48	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
50	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
51	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
52	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO

Nota: Chumeca se refiere al cruce entre las razas Holstein-Jersey.

Anexo 6.2.3. Individuos positivos a T. vivax en la Finca 3.

Muestra			Resultado PCR		
Individuos (Hembras)			Muestreos		
Identificación	Raza	Edad	22 Junio	21 Octubre	26 Noviembre
1	Pardo	9 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
8	Holstein	11 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
12	Holstein	11 años	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
15	Holstein	11 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
20	Holstein	11 años	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
24	Holstein	11 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
28	Holstein	11 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
54	Jersey	9 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
58	Holstein	9 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
94	Holstein	7 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
95	Holstein	7 años	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
97	Jersey	7 años	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
107	Sin definir	7 años	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
108	Holstein	7 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
117	Holstein	6 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
118	Holstein	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
125	Holstein	6 años	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
126	Jersey	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
127	Jersey	6 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
128	Chumeca	6 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
131	Chumeca	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
133	Holstein	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
135	Holstein	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
138	Holstein	5 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
139	Chumeca	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
142	Jersey	5 años	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
144	Holstein	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
146	Holstein	5 años	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
147	Chumeca	5 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
148	Holstein	5 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
149	Holstein	5 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
152	Holstein	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
155	Holstein	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
158	Jersey	5 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
161	Holstein	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
163	Holstein	4 años	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
166	Jersey	4 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
167	Holstein	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
174	Sin definir	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
177	Holstein	4 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
196	Chumeca	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

Nota: Chumeca se refiere al cruce entre las razas Holstein-Jersey.

Anexo 6.2.4. Individuos positivos a T. vivax en la Finca 4.

Muestra			Resultado PCR			
Individuos (Hembras)			Muestreos			
Identificación	Raza	Edad	23 Junio	31 Agosto	20 Octubre	25 Noviembre
315	Jersey	7 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
328	Jersey	7 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
353	Jersey	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
355	Jersey	6 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
357	Jersey	6 años	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
363	Jersey	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
365	Jersey	6 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
368	Jersey	6 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
374	Jersey	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
376	Jersey	6 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
381	Jersey	5 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
384	Jersey	5 años	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
387	Jersey	5 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
390	Jersey	5 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
394	Jersey	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
396	Jersey	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
397	Jersey	5 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
401	Jersey	5 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
402	Jersey	5 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
412	Jersey	5 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
414	Jersey	4 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
415	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
416	Jersey	4 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
419	Jersey	4 años	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
424	Jersey	4 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
425	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
427	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
428	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
431	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
433	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
435	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
439	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
440	Jersey	4 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
442	Jersey	4 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
449	Jersey	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
450	Jersey	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
451	Jersey	3 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
452	Jersey	3 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
453	Jersey	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
455	Jersey	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
457	Jersey	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
459	Jersey	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
462	Jersey	3 años	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
466	Jersey	3 años	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

Anexo 6.2.5. Individuos positivos a T. vivax en la Finca 5.

Muestra			Resultado PCR			
Individuos (Hembras)			Muestreos			
Identificación	Raza	# Partos	23 Junio	1 Setiembre	20 Octubre	25 Noviembre
8	Chumeca	4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
19	Chumeca	-	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
47	Chumeca	5	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
51	Holstein	5	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
63	Chumeca	2	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
66	Chumeca	2	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
70	Chumeca	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
72	Chumeca	1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
74	Chumeca	1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
76	Holstein	2	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
77	Holstein	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
101	Pardo suizo	4	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
106	Chumeca	3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
111	Chumeca	2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
120	Holstein	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
149	Chumeca	3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
162	Chumeca	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
167	Chumeca	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
173	Holstein	3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
178	Holstein	4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
183	Chumeca	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
184	Holstein	4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
201	Chumeca	1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
202	Chumeca	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
206	Chumeca	1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
427	Holstein	2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Micaela	Chumeca	4	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

Nota₁: Debido a que no existe registro de la edad de los animales se toma como una referencia el número de partos, asumiendo que los individuos más viejos serán, por lo general, aquellos con mayor número.

Nota₂: Chumeca se refiere al cruce entre las razas Holstein-Jersey.

Anexo 6.2.6. Individuos positivos a *T. vivax* en la Finca 6.

Muestra			Resultado PCR			
Individuos (Hembras)			Muestreos			
Identificación	Raza	# Partos	23 Junio	1 Setiembre	20 Octubre	25 Noviembre
1	Holstein	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
30	Chumeca	4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
40	Chumeca	4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
41	Chumeca	3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
50	Jersey	3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-
65	Holstein	3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
70	Holstein	3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
72	Jersey	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
88	Holstein	4	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
204	Holstein	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-
207	Holstein	1	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	-
208	Holstein	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-
209	Holstein	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
213	Chumeca	1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
215	Holstein	3	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-
218	Holstein	1	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
219	Holstein	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-
221	Holstein	1	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO
222	Holstein	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
231	Holstein	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
245	Chumeca	1	NEGATIVO	-	NEGATIVO	POSITIVO
252	Chumeca	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
256	Chumeca	2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
257	Pardo suizo	3	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
258	Chumeca	2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-
259	Pardo suizo	3	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
494	Holstein	2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
507	Holstein	1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
Zopilota	Sin definir	5	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO

Nota₁: Debido a que no existe registro de la edad de los animales se toma como una referencia el número de partos.

Nota₂: Chumeca se refiere al cruce entre las razas Holstein-Jersey.