

# 1. INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma* es un notable género de protozoos, grupo monofilético de parásitos unicelulares. El nombre viene del griego *trypaô* (taladro) y de *soma* (cuerpo) debido a la manera en que el organismo se mueve. Diferentes especies infectan a distintos vertebrados, incluso humanos, causando las enfermedades de tripanosomosis, (enfermedad del sueño, en África, y Mal de Chagas en América). Muchas especies se transmiten por invertebrados tales como insectos picadores y chupadores.

Tripanosoma tiene un complejo ciclo de vida, que incluye diferentes formas morfológicas especialmente en las especies que se transmiten vía invertebrados.

En la actualidad, a pesar de conocer la evidencia serológica de *Trypanosoma spp.* en bovinos en El Salvador por el estudio que llevaron a cabo Rice y Calderón en el año de 1975, y porque las bibliografías sobre parasitología también lo establecen en Centroamérica, no existe un estudio actualizado que proporcione información viable sobre la parasitosis en nuestro país. Sin embargo, en nuestro medio no se contempla la posibilidad real de *Trypanosoma spp.* en bovinos, así como la elección de un método rutinario de laboratorio para su diagnóstico, lo que genera pérdida de información de interés epidemiológico.

El *Trypanosoma spp* afecta al ganado bovino produciendo enfermedad anemizante con consecuencias negativas tanto para la producción y la reproducción del mismo. La tripanosomosis conlleva un impacto económico por las pérdidas en la producción, debidas a bajas en la ganancia de peso, producción lechera, abortos, repetición de celos, como resultado de la acción hemoparasitaria.

El Salvador posee los factores climáticos propios para el desarrollo de *Trypanosoma spp.*, presenta los vectores necesarios para su propagación, así

como los hospedadores necesarios para mantener un estado enzoótico de tripanosomosis.

Tomando en cuenta lo anterior, el propósito del presente estudio fue determinar la presencia de *Trypanosoma spp* en bovinos, y poder con ello generar información sobre la situación del hemoparásito en nuestro país.

Durante el estudio se tomaron muestras sanguíneas para efectuar diagnóstico de *Trypanosoma*, mediante las técnicas de laboratorio de Woo, Tinción de Frotis Sanguíneo, además de la medición del nivel de hematocrito de los bovinos en estudio.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 DEFINICIÓN

Los protozoarios flagelados del género *Trypanosoma* son parásitos ubicuos que se encuentran en todas las clases de vertebrados y son transmitidos por artrópodos hematófagos. Los tripanosomas generalmente sufren uno o más ciclos de desarrollo y multiplicación en el tracto alimentario del insecto, antes de que las formas infectivas sean transmitidas a un nuevo vertebrado por la vía salival, por contaminación con heces o por ingestión del vector.<sup>16</sup>

Los tripanosomas tienen una variedad de diferentes formas en el hospedador invertebrado, y en los hospedadores vertebrados las células toman una forma característica llamada tripomastigote, donde el flagelo corre de atrás hacia adelante de la célula y se conecta por una membrana ondulante.<sup>32, 8, 5</sup>

### 2.2 HISTORIA

Los tripanosomas aparecieron muy temprano en la evolución, hace aproximadamente 680 millones de años, es posible que hayan infectado a mamíferos primitivos y que, por lo tanto, su evolución podría estar al menos en parte correlacionada con la evolución de los mamíferos continentales. Cuando se presentó la deriva de los continentes y los movimientos de las placas tectónicas y el supercontinente Pangaea se dividió, también quedaron limitadas las dos líneas de parásitos; se ha sugerido que *T. cruzi* volvió a diferenciarse de los otros Tripanosomas hace 475 millones de años; esta época fue varios millones de años antes de la evolución de los primeros insectos y de los primeros vertebrados terrestres sucedida hace 380 millones de años. Posteriormente hubo una evolución de dos linajes de *T. cruzi*; se piensa que la diferenciación ocurrió hace 88 a 37 millones de años, después de lo cual cada linaje sufrió historias evolutivas separadas en el norte y el sur de América relacionadas sobre todo con las faunas de mamíferos particulares de las dos regiones. Esta última evolución de los dos subgrupos de *T. cruzi* se ha correlacionado con el intercambio de las faunas de mamíferos americanos que

sucedió en la era Cenozoica y tiene implicaciones relacionadas con la patogenicidad y la especificidad del huésped, es decir, la identificación del subgrupo tiene importancia clínica. El subgrupo 2 es nativo de América del Sur, aunque el subgrupo 1 se introdujo más recientemente a Sudamérica, junto con los mamíferos de tipo placentario, después de la conexión de las Américas en el Plioceno, hace 5 millones de años, a través del istmo de Panamá. Esto podría explicar la asociación preferencial del linaje 2 con animales marsupiales y del linaje 1 con la enfermedad humana. La relevancia de estos hallazgos con respecto a las propiedades biológicas y epidemiológicas de *T. cruzi* es que sugieren que el linaje 1 predomina en el ciclo doméstico y podría promover altas parasitemias en humanos, aunque el linaje 2 está presente principalmente en el ciclo selvático.<sup>16</sup>

En África, los primeros homínidos evolucionaron hace 5 a 15 millones de años, el género *Homo* hace 3 millones de años y el *Homo sapiens* no más temprano que hace 300,000 años, presumiblemente en continuo contacto con moscas Tse-Tsé y tripanosomas africanos. En contraste, el contacto humano con *T. cruzi* podría no haber ocurrido previo a la migración humana a las Américas, la cual data de hace 30-40,000 años. Así, aunque *T. brucei* ha coevolucionado con los homínidos desde África, *T. cruzi* ha evolucionado principalmente en ausencia del hombre, sin embargo ambos permanecen altamente patogénicos para los humanos a pesar de sus historias evolutivas muy diferentes.<sup>16</sup>

## 2.3 ETIOLOGÍA

### 2.3.1 Clasificación Taxonómica

**Phylum:** *Sarcomastigophora*

**Subphylum:** *Mastigophora*

**Clase:** *Zoomastigophora*

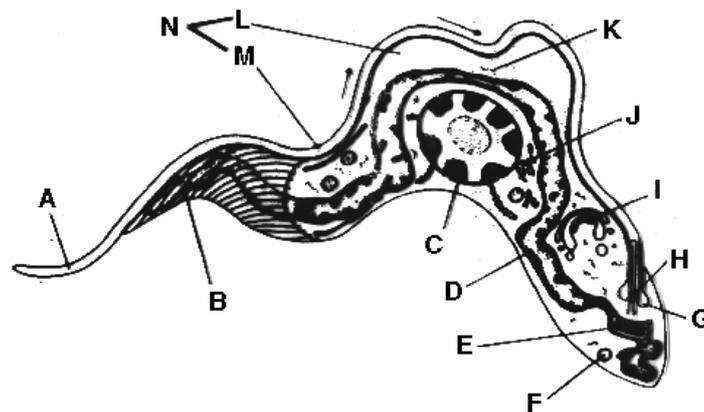
**Orden:** *Kinetoplastida*

**Familia:** *Trypanosomatidae*

**Genero:** *Trypanosoma*<sup>8, 5</sup>

Los miembros de este género (*Trypanosoma*) se presentan en vertebrados, principalmente en la sangre y tejidos fluidos, aunque unos pocos pueden invadir células tisulares. Son transmitidos por artrópodos hematófagos, en los que se desarrollan las primeras fases evolutivas. Algunas especies son transmitidas mecánicamente; dicho con otras palabras, no hay desarrollo cíclico en el artrópodo.<sup>8</sup>

La especiación dentro de este género es muy compleja, por lo que se recurre a la localización geográfica del parásito, desarrollo en el vector, capacidad patógena, caracteres morfológicos y morfométricos (como longitud total y del flagelo, posición del núcleo y complejo kinetoplástico, etc) y en la actualidad a métodos isoenzimáticos e inmunológicos.<sup>5</sup>



**Figura 1. Diagrama Esquemático de un Tripanosoma**

A- Flagelo anterior. B- Citoesqueleto subyacente complejo. C- Núcleo. D- Mitocondrias. E- Kinetoplasto. F- Glicosoma (organelo único donde ocurre la glicólisis). G- Bolsillo flagelar. H- Cuerpo parabasal. I- aparato del Golgi. J- Retículo endoplasmático. K- Membrana ondulante. L- flagelos accesorio de la membrana ondulante. M- Flagelo accesorio unido al cuerpo de la célula

[www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/afr\\_sl\\_siickness.html](http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/afr_sl_siickness.html)

### 2.3.2 Estados del Ciclo Biológico de Tripanosoma

Cada parásito, podrá pasar por más de una forma evolutiva a lo largo de su ciclo de vida, según se encuentre en el hospedador vertebrado o invertebrado.

Estado tripomastigote (previamente, estado tripanosómico). Forma lanceolada con un kinetoplasto situado por detrás del núcleo y, generalmente, próximo al

extremo posterior. A menudo, se presenta una membrana ondulante bien desarrollada, y un flagelo libre. Con frecuencia esta fase se encuentra en el hospedador vertebrado, pero también se puede localizar en artrópodos, como la forma infectante del hospedador vertebrado.<sup>5</sup>

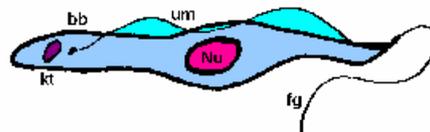


Figura 2. Estado tripomastigote

Estado Epimastigote (previamente, forma crithidial). Tanto el kinetoplasto como el axonema yacen por delante del núcleo, y la membrana ondulante es corta. En unas pocas especies, esta etapa aparece en el vertebrado como parte del ciclo de desarrollo en dicho hospedador, pero principalmente se trata de un estado de los artrópodos.<sup>5</sup>

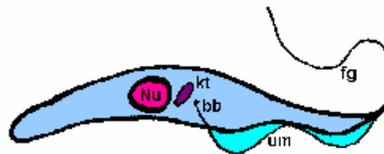


Figura 3. Estado Epimastigote

Estado Promastigote (previamente, forma leptomonadica). El kinetoplasto y el axonema están en el extremo anterior del cuerpo. No tiene membrana ondulante. Se presenta en artrópodos.<sup>5</sup>

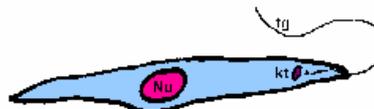
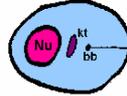


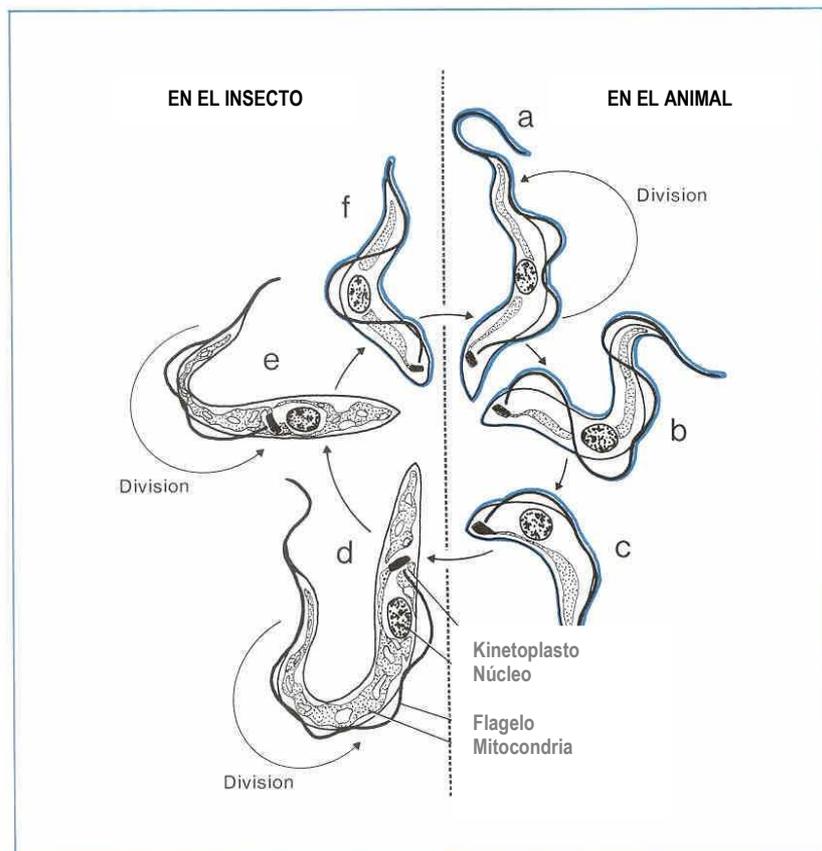
Figura 4. Estado Promastigote

Estado Amastigote (previamente, forma leishmania). El cuerpo es redondeado; el flagelo no se presenta, o se encuentra reducido a una corta fibrilla. Forma típica de vertebrados y artrópodos.<sup>5</sup>



**Figura 5. Estado Amastigote**  
[www.tulane.edu/.../protozoology/notes/kinet.html](http://www.tulane.edu/.../protozoology/notes/kinet.html)

## 2.4 CICLO BIOLÓGICO DE *Trypanosoma spp.*



**Figura 6. Ciclo biológico de *Trypanosoma*.**

La infección comienza cuando los tripanosomas son inoculados en la sangre de un mamífero por el insecto vector mientras éste se alimenta del animal. En el hospedador vertebrado las formas delgadas de los parásitos (a) se multiplican o se reproducen por fisión binaria, hasta conseguir que un gran número de parásitos se acumulen en la sangre. Los tripanosomas entonces adquieren una forma intermedia (b) para posteriormente adquirir la forma rechoncha; esta última es la que ingiere el hospedador invertebrado y vector mientras se alimenta del animal. En el interior del insecto vector se presentan las formas policíclicas (d) y se produce la división para que posteriormente los parásitos pasen al proventrículo y después a las glándulas salivales del insecto donde adquieren la forma de epimastigote (e) y experimente una división adicional. Finalmente las formas metacíclicas (f) se presentan en las glándulas salivales del invertebrado. Las formas metacíclicas son las que llegan a infectar a los animales, y así de esta manera se repite el ciclo vital.<sup>15</sup>

[www.ilri.org/.../Fulldocs/llrad90/Trypano.htm](http://www.ilri.org/.../Fulldocs/llrad90/Trypano.htm)

El *Trypanosoma* se reproduce por división binaria longitudinal, no conociéndose la reproducción sexual. En el hospedador vertebrado está, en las primeras etapas de la enfermedad en la sangre periférica, donde se dividen longitudinalmente y varían su forma. Hay formas finas, intermedias y gruesas. Después pasa a los ganglios linfáticos y líquido cefalo-raquídeo. El invertebrado hematófago ingiere la sangre con tripanosomas que cambian a formas alargadas, éstos, al principio, se limitan a áreas del tracto digestivo rodeadas de la membrana peritrófica y la pared del intestino. Luego se mueven y ascienden llegando a las glándulas salivales, donde continúan su desarrollo a formas metacíclicas que son inoculadas al vertebrado, junto con la saliva, en la siguiente fase de alimentación del insecto.<sup>5,8</sup>

## 2.5 ESPECIES DE TRIPANOSOMAS

**2.5.1 *Trypanosoma vivax* Zieman, 1905.** Es una especie monomórfica, de 20 – 27  $\mu\text{m}$  (media 22.5  $\mu\text{m}$ ) por 3 mm. Su porción posterior, más ancha y bulbosa, es inconfundible, el kinetoplasto es grande y terminal y presenta un flagelo libre, corto, de 3-6 mm de longitud. El organismo es muy móvil en sangre fresca, desplazándose rápidamente a través del campo y dejando a un lado a los eritrocitos que encuentra en su camino.<sup>8</sup>

*T. vivax* causa la forma más importante de tripanosomosis del ganado vacuno, puede producir una enfermedad asintomática o crónica, aguda o peraguda. Las infecciones peragudas se caracterizan por una parasitemia alta y persistente, aunque en el momento de la muerte puede ser muy baja.<sup>4</sup>

*T. vivax* tienen un período de incubación variable (4 a 40 días); sin embargo, pueden ocurrir mortalidades de más del 50%. Parece haber una variación marcada en la virulencia con diferentes cepas de *T. vivax*; pero sigue siendo la causa más importante de tripanosomosis en bovinos, borregos y ovejas de África Occidental. Causa también una enfermedad leve en los caballos y una infección crónica en los perros. El *T. vivax* con frecuencia es difícil de encontrar en los frotis sanguíneos y se observa mejor en frotis de ganglios linfáticos.<sup>4</sup>

**2.5.2 *Trypanosoma evansi* Balbiani, 1888.** Fue el primer tripanosoma identificado como patógeno para mamíferos.

En la mayoría de las infecciones, se presenta como monomórfico, aunque esporádicamente puede experimentar polimorfismo. La forma típica es indistinguible de la forma delgada de *T. brucei*, de 15-34  $\mu\text{m}$  de longitud (media 24  $\mu\text{m}$ ), el kinetoplasto es subterminal, la membrana ondulante está bien desarrollada y existe un flagelo libre sustancial. Esporádicamente pueden aparecer formas rechonchas.<sup>8</sup>

La transmisión se hace por moscas picadoras, tales como *Tábanos*, *Stomoxys* y *Lyperosia*. No se presenta desarrollo cíclico en este tipo de parásitos. Un factor esencial de la transmisión mecánica es la alimentación interrumpida de las moscas, que rápidamente buscan un nuevo hospedador, con el fin de saciarse. Los tripanosomas no sobreviven más de 10-15 minutos en la probóscide de una mosca.<sup>8</sup>

**2.5.3 *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909.** Es la especie más patógena de los Stercoraria. Causante de la tripanosomosis humana americana o enfermedad de Chagas en América. En la sangre es monomórfico, mide 16-20  $\mu\text{m}$  de longitud, y presenta forma de cuarto creciente con un extremo posterior puntiagudo. El kinetoplasto es grande y subterminal, ocupando la totalidad de esta porción del cuerpo. El núcleo es central, con membrana ondulante moderadamente desarrollada y flagelo libre. Las divisiones ocurren en las fases amastigote, y no en la tripomastigote. Las formas en división aparecen como cuerpos de 1.5-4  $\mu\text{m}$  de diámetro en músculo y otras células, especialmente en las del músculo cardíaco.<sup>8</sup>

Los mamíferos de gran porte como bovinos y equinos no son considerados reservorios de *T. cruzi*, por lo menos cuando son inoculados experimentalmente. Cerdos, ovinos y caprinos pueden presentar parasitemia transitoria en infección experimental pero su papel como reservorio no está bien establecido.<sup>17</sup>

**2.5.4 *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902.** Es una especie relativamente grande, 60-70  $\mu\text{m}$  de longitud, aunque puede alcanzar más de 120  $\mu\text{m}$ , especialmente en infecciones crónicas. Se han observado formas

semejantes a *Trypanosoma theileri* en animales del orden Artiodactyla. El extremo posterior es largo y puntiagudo, disponiéndose el kinetoplasto a cierta distancia del mismo. La membrana ondulante está bien desarrollada y el flagelo libre es definido.<sup>8</sup>

Es un hecho comprobado que *T. theileri* se transmite cíclicamente en desarrollo posterior mediante tábanos como *Tabanus* y *Haematopota*, infectándose los bovinos por contaminación. En estos bovinos se presentan tanto formas tripomastigote como epimastigote, y la multiplicación tiene lugar principalmente en ganglios linfáticos y órganos internos.<sup>8</sup>

En condiciones normales, *T. theileri* es no patógeno, distribuido probablemente por el ganado de todo el mundo. Sin embargo, y ocasionalmente, puede producir una forma parasitémica tras esplenectomías, en situaciones de estrés o cuando se presentan infecciones concomitantes con agentes patógenos.<sup>8</sup>

## **2.6 TRANSMISIÓN**

La transmisión de tripanosomas depende del subgénero y la especie involucrada, en el caso de *T. vivax* y *T. theileri* en América Latina se ha señalado la transmisión al ganado bovino a través de dípteros hematófagos (*Tabanidae* y *Stomoxys*) mosquitos, jejenes y *Simulidae*.

El ciclo de vida del tripanosoma es heteroxeno, necesitando normalmente de un hospedador invertebrado para su transmisión, la cual se puede producir de distinta forma dependiendo de la especie parásita que se trate y que se explica a continuación:<sup>8</sup>

### **2.6.1 Según el contagio de la forma parásita**

Contaminativa: en la que la forma infectante sale con las heces del hospedador invertebrado. Entonces penetra en el hospedador vertebrado a través de soluciones de continuidad producidas en la piel, tras el prurito intenso de la picadura, heces o ambos del insecto, y posterior acción de rascarse. Los parásitos con este tipo de contagio integran la sección *Stercoraria*, o de

estación posterior, los cuales se desarrollan en la zona distal del tubo digestivo del vector. <sup>5, 8</sup>

Inoculativa: el parásito es introducido en el vertebrado al ser regurgitado por el insecto, penetrando en el acto de succión de sangre, como método de alimentación de éste. Aquellas especies que usan este tipo de contagio, se encuadran dentro de la sección *Salivaria*, o de estación anterior. Estos parásitos se desarrollan en la zona proximal del tubo digestivo de los artrópodos, en su probóscide o en sus glándulas salivales. <sup>5, 8</sup>

### **2.6.2 Según el ciclo de vida en el interior del vector**

Mecánica: sin reproducción en el vector

Cíclica: con reproducción en el hospedador intermediario. <sup>5</sup>

### **2.6.3 En el hospedador definitivo**

En el ciclo biológico de los tripanosomas no se ha observado proceso sexual alguno, y toda la reproducción transcurre por fisión binaria o múltiple. La división comienza en el kinetoplasto, seguida por el núcleo y a continuación, el citoplasma. En los *Salivarias*, la división tiene lugar principalmente durante la fase tripomastigote en la sangre o en los ganglios linfáticos. Con los *Stercoraria*, sin embargo, es frecuente la reproducción en las formas epimastigote y amastigote. <sup>8</sup>

Al igual que las distintas fases de desarrollo en las diversas especies, el polimorfismo también tiene lugar en un mismo tripanosoma. Habiéndose observado variaciones en formas y tamaños en determinadas especies.

Algunas especies y cepas de tripanosomas pueden ser adaptadas a hospedadores no habituales mediante pases seriados. Dicha adaptación será un proceso corto o prolongado, según el caso, pero siempre está asociada con una virulencia incrementada para el nuevo hospedador. <sup>8</sup>

Los cambios en el metabolismo del tripanosoma van acompañados por cambios morfológicos. <sup>8</sup>

Un conocimiento justificado de los rasgos básicos de varios tripanosomas permite la identificación de cada especie. <sup>7, 8, 5</sup>

## **2.7 ASPECTOS CLÍNICOS**

La anemia puede presentarse como consecuencia de infecciones con tripanosomas en los animales domésticos en general y en los bovinos en particular.<sup>9</sup>

Durante la enfermedad, la anemia usualmente se presenta con la primera ola de parasitemia, aunque suele no observarse en la fase temprana de la tripanosomosis. El subsecuente desarrollo de la anemia está determinado por la frecuencia e intensidad de la parasitemia.<sup>9</sup>

### **2.7.1 Definición de Anemia**

La anemia es la reducción por debajo de lo normal del número de eritrocitos y/o de la concentración de hemoglobina por unidad de volumen de sangre.

Con frecuencia, la anemia es un síntoma de una enfermedad más que una enfermedad en sí misma y, en general, se desarrolla debido a la presencia de uno de estos factores: pérdida excesiva de sangre o hemorragia, producción insuficiente de glóbulos rojos, destrucción excesiva de glóbulos rojos, disminución de la producción y excesiva destrucción de glóbulos rojos.<sup>18</sup>

En estudios realizados se ha demostrado que al inocular experimentalmente *T. vivax* en vacas Holstein, se produce una anemia del tipo normocítica normocrómica, y etiológicamente la anemia es producida por destrucción excesiva de eritrocitos.<sup>9</sup>

## **2.8 EPIDEMIOLOGÍA**

Las tripanosomosis son enfermedades cosmopolitas, aunque se encuentran principalmente en áreas tropicales o subtropicales de África y América.

### **2.8.1 Situación de Tripanosoma en América Latina**

En Honduras en el año de 1929, fue detectado un tripanosoma morfológicamente semejante a *Trypanosoma cruzi*, encontrado en una zarigüeya (*Didelphys marsupialis*), capturada en Tela.<sup>7</sup>

En Costa Rica en el año 1983, Evans Benavides llevó a cabo un estudio con el propósito de diagnosticar *Trypanosoma* en bovinos provenientes de rastros nacionales, donde se encontró una positividad para *T. theileri* de 4.9% en un grupo, utilizando la técnica de concentración en tubo capilar o microhematocrito; y de 46.5% de positividad en otro grupo de bovinos examinados por dos técnicas; la anteriormente citada y la técnica de cultivo (Senekjie modificado y Senekjie hemolizado).<sup>10</sup>

En el año de 1991, la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Rómulo Gallegos en San Juan de los Morros, Venezuela, realizó un estudio para detectar la seroprevalencia de tripanosomosis por *Trypanosoma vivax* en Búfalos (*Bubalis bubalis*), en dos Fincas del Estado Guárico. Se procesaron un total de 240 muestras sanguíneas de búfalos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Como resultados se obtuvo una seroprevalencia promedio de 29,5% donde el 75% eran animales adultos, con una distribución por sexo de 75% en hembras y 25% en machos.<sup>28</sup>

En el año de 1993, en el Estado Guárico, Venezuela, se encontró una prevalencia de *T. vivax* del 79.8% en vacunos de doble propósito, en tanto que en ganado altamente acebuado fue de 76.4%.<sup>28</sup>

En 1995 se reportaron brotes de *T. vivax* en ganado seleccionado de Brasil, donde se encontró una prevalencia del 34%; en Laguna Concepción, Bolivia, se halló el 86%. En ambos estudios las pruebas utilizadas fueron ELISA e IFI.<sup>27</sup>

En Guatemala en 1998, Moscoso Montoya evaluó la presencia de *Trypanosoma cruzi* en 40 mapaches (*Procyon lotor*) procedentes de 4 zoológicos, encontrando 0% de prevalencia, por la prueba de Hemoaglutinación indirecta.<sup>19</sup>

En Perú en el año 2000, se realizó un estudio sobre la prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de Selva Alta en la provincia de Chachapoyas, Amazonas. La prevalencia de *T. vivax* en 270 frotis sanguíneos (coloreados con Giemsa) de bovinos criollos fue de  $10.0 \pm 3.6\%$ .<sup>28</sup>

En el año 2000, en Perú se realizó un estudio para determinar la prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de cuatro distritos de la provincia de Coronel Portillo, Ucayali.<sup>27</sup>

En Venezuela, en el año 2006 se realizó un estudio para la detección subclínica por *T. vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Merida. El diagnóstico fue realizado utilizando métodos parasitológicos (examen microscópico de muestra fresca, microcapilar y láminas coloreadas), bioquímicos (Western blot) y moleculares (PCR) en muestras sanguíneas. Las pruebas parasitológicas revelaron positividad en 2 de los 72 bovinos examinados (2,8%). Las infecciones subclínicas o asintomáticas detectadas por métodos parasitológicos fueron corroboradas por PCR en muestra de sangre de ambos animales, de los cuales solo uno demostró una reacción positiva.<sup>3</sup>

## **2.9 DIAGNÓSTICO DE *Trypanosoma spp.***

Los métodos diagnósticos específicos consisten en: a) la demostración directa de la presencia del parásito por observación microscópica o en forma indirecta, por xenodiagnostico, inoculación de animales de laboratorio y hemocultivo y b) pruebas serológicas.<sup>13, 6, 3, 11</sup>

Cuando el número de parásitos en la sangre es elevado, como en el período agudo de la enfermedad, se puede comprobar la presencia del parásito por observación microscópica de la sangre fresca entre cubre y portaobjeto, y de extensiones y gota gruesa teñida por Giemsa o Wright. Un método práctico y muy eficiente es el procedimiento de Woo de concentración de hemoflagelados por centrifugación de la sangre y observación en fresco del sedimento del suero formado entre éste y el coágulo.<sup>3,13, 6</sup>

### **2.9.1 Técnicas directas para el diagnostico de *Tripanosoma***

Las técnicas de diagnóstico directo son útiles en el trabajo de campo. No obstante, su sensibilidad es relativa, ya que, por lo general registran cierta proporción de falsos negativos, como en los casos crónicos o de evolución prolongada, el número de tripanosomas en la sangre periférica disminuye; por

ello, es recomendable repetir todas las muestras negativas o complementarlas con otras técnicas antes de establecer un diagnóstico definitivo.<sup>13,6</sup>

Existen diferentes técnicas de sensibilidad variable y detección directa para el diagnóstico de hemoparásitos; la adopción de una u otra dependerá de los recursos (tecnología e instalaciones disponibles) del laboratorio.

Muchos de los integrantes del subgénero *Trypanozoon*, como *Trypanosoma evansi* por ejemplo, son parásitos de la sangre que, en ciertos casos, pueden presentar baja parasitemia, razón por la cual se recomienda obtener muestras de sangre tanto de vasos periféricos como profundos.<sup>22</sup>

Es importante tener presente que menos del 50% de los animales infectados pueden ser identificados por el examen de sangre periférica.<sup>22</sup>

#### **2.9.1.1 Examen de sangre en fresco**

Se deposita una gota de sangre sobre un portaobjetos y se recubre con un cubreobjetos. Se observa directamente la preparación al microscopio con el objetivo 40x y una abertura reducida del diafragma del condensador. Los tripanosomas se pueden reconocer por su movimiento entre los hematíes inmóviles.<sup>21,22,11</sup>

#### **2.9.1.2 Semiextensión de sangre (gota gruesa)**

Se coloca una gota grande de sangre sobre un portaobjetos y utilizando el borde de otro portaobjetos, se extiende sobre un área circular de unos 2 cm de diámetro. Se seca rápidamente abanicando el portaobjetos en el aire y, sin fijar previamente, se tiñe la preparación durante 30 minutos con una solución de colorante Giemsa al 4% en agua corriente. Considerando que el tiempo y la dilución de tinción pueden variar en función del fabricante del colorante y del protocolo concreto que se utilice, se recomienda empezar siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la tinción, el portaobjetos se lava suavemente con agua corriente y se observa al microscopio, usando para ello el objetivo de inmersión 100x. Es fácil reconocer a los tripanosomas por su morfología

general. No obstante, es posible que hayan resultado dañados en el curso del proceso y ello puede dificultar la identificación de la especie.<sup>11, 22</sup>

### **2.9.1.3 Extensión de sangre**

Esta técnica resulta especialmente útil para confirmar la identidad de la especie de tripanosoma. Se coloca una gota pequeña de sangre sobre un portaobjetos limpio. Se toma un segundo portaobjetos, se sitúa sobre uno de los extremos del primero formando un ángulo aproximado de 30° y se pone en contacto con la gota de sangre. Cuando la sangre se ha distribuido a lo largo del borde del portaobjetos inclinado, se desplaza conservando la inclinación, el otro extremo del portaobjetos horizontal. La sangre debe formar una monocapa fina y homogénea. Se seca rápidamente abanicando el portaobjetos en el aire, se fija en metanol durante 3 minutos y se tiñe siguiendo el protocolo descrito para la semiextensión de sangre. A continuación se somete el portaobjetos a un suave lavado con agua corriente, se deja secar y se examina finalmente al microscopio con el objetivo 40x y objetivo de inmersión 100x. Este método permite identificar las especies de *Trypanosoma* por sus características morfológicas.<sup>21,22</sup>

### **2.9.1.4 Centrifugación en tubos de hematocrito (prueba de Woo):**

Muchos parásitos inducen en la mayoría de sus hospedadores evoluciones benignas o subclínicas de la enfermedad. En tales condiciones, la parasitemia es baja y la identificación del parásito difícil. Ello hace indispensable la aplicación de técnicas de concentración de parásitos como la diseñada por Woo (1969). Se colocan 70 µl de sangre en un tubo capilar heparinizado (75 x 1,5 mm). Se sella el extremo seco del tubo y, con éste orientado hacia abajo, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. Se coloca el capilar sobre un portaobjetos provisto de bornes que impidan su desplazamiento (dos piezas de vidrio 25 x 10 x 1,2 mm adheridas al portaobjetos). Se coloca un cubreobjetos a nivel de la zona leucocitaria (franja blancuzca), allí estarán concentrados los tripanosomas. Se sumerge el espacio libre alrededor de esta zona en agua o

aceite de inmersión y, posteriormente se examina la capa leucocitaria al microscopio con el objetivo 10x ó 20x.<sup>11, 22</sup>

### **2.9.2 Técnicas indirectas para el diagnóstico de Tripanosoma**

El objetivo de las pruebas serológicas es detectar anticuerpos específicos (que son proteínas de la sangre pertenecientes a las inmunoglobulinas), desarrollados por el huésped en contra de la infección o, inversamente, para demostrar la presencia de antígenos de parásitos que circulan en la sangre mediante el uso de anticuerpos específicos caracterizados. La detección de anticuerpos indica que se ha producido la infección, pero como los anticuerpos persisten durante algún tiempo (semanas, y a veces meses) después que todos los tripanosomas han desaparecido del organismo (ya sea por el tratamiento farmacológico o cura espontánea), un resultado positivo no es una prueba de la infección activa.

Las pruebas serológicas más usadas son las de inmunofluorescencia indirecta (IF), ELISA y PCR.<sup>11, 22, 29</sup>

#### **2.9.2.1 ELISA**

El principio general de esta técnica es sencillo, pues se basa en el reconocimiento de un antígeno por parte de un anticuerpo que, fundamentado en una reacción colorimétrica mediante el uso de un anticuerpo marcado con una enzima, se puede cuantificar el grado de positividad de una muestra de suero problema. La transformación del sustrato por la enzima es proporcional a la concentración de anticuerpo o antígeno desconocido presente en la solución problema. De esta manera, los anticuerpos específicos pueden ser estimados cuantitativamente y en poco tiempo.<sup>11, 22, 29</sup>

El ensayo inmunoenzimático ELISA se presenta como una alternativa muy especialmente para el serodiagnóstico. En este sentido, así como en otros ensayos serodiagnósticos, puede utilizarse un antígeno crudo, es decir, aquel que contiene una mezcla de los componentes del organismo a detectar, o un antígeno con grados de purificación diversos, que finalmente dependerán de la

sensibilidad y especificidad que se desea conferir al ensayo. Así como existe una gran variedad en cuanto al antígeno a utilizar también la hay en relación a los conjugados, de lo cual se derivan los diversos tipos de ELISA que existen actualmente, siendo los más utilizados:

- ELISA directo: cuando los anticuerpos conjugados a la enzima son dirigidos directamente contra el antígeno unido a la placa.
- ELISA indirecto: cuando los anticuerpos conjugados son dirigidos contra inmunoglobulinas humanas o de animales que sufren la enfermedad en cuestión.
- ELISA sándwich: Cuando se utilizan dos anticuerpos específicos que reconocen un mismo antígeno, uno de ellos marcado radiactivamente o unido a una enzima. Este tipo de ensayo permite la captura de antígenos circulantes (solubles).

El ELISA tipo indirecto es uno de los más utilizados para el diagnóstico de hemoparásitos. Este ensayo se inicia con la absorción de las proteínas (antígeno) a una superficie inerte, generalmente una placa de polivinilo de 96 pozos. Posteriormente se agrega una solución de una proteína no específica y económica, generalmente leche descremada o gelatina, para bloquear la superficie evitando que otras proteínas se unan a ella. Luego se añade el suero problema que contiene los anticuerpos que reconocen al antígeno de manera específica (en el caso que la muestra sea positiva). Seguido a ello se agrega un anticuerpo secundario que reconocerá al anticuerpo primario unido al antígeno. Este anticuerpo secundario es conjugado a una enzima que cataliza una reacción colorimétrica. Finalmente se añade el sustrato de la enzima y se registra la densidad óptica.<sup>29</sup>

### **2.9.2.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)**

La reacción en cadena de la polimerasa (comúnmente llamada PCR por sus siglas en inglés), permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Para llevar a cabo la reacción se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos, también conocidos como

cebadores o primers, los cuales son complementarios a las regiones flanqueantes de la secuencia a amplificar. La síntesis de ADN es producida por una enzima que se conoce como Taq Polimerasa, la cual se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquáticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85°C), confiriéndole la capacidad de ser termoestable; esta enzima es la encargada de “colocar” de manera complementaria los nucleótidos (dNTPs) produciendo así una cadena de ADN complementaria a la ya existente.<sup>12,21</sup>

La enzima necesita cloruro de magnesio como cofactor. La técnica consta de tres grandes pasos: desnaturalización, hibridación y extensión.

La desnaturalización se consigue aplicando altas temperaturas (90 a 95°C) para separar las cadenas del ADN molde, mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno. Posteriormente, en la hibridación (o “annealing”), una vez que el ADN está desnaturalizado, se disminuye la temperatura (entre 40 y 60°C) para que se pueda producir la unión de los cebadores a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. Es evidente, que la temperatura seleccionada tiene que ser muy específica, ya que si es muy alta o muy baja, los cebadores no se van a unir eficientemente al ADN de interés. Por último, viene el proceso de extensión, en donde la Taq polimerasa incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada.<sup>12</sup>

La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C, ya que es la temperatura a la que la Taq polimerasa alcanza su máxima actividad. Todos estos procesos se llevan a cabo en los instrumentos diseñados para dicho fin, llamados termocicladores, en donde las etapas antes descritas se repiten aproximadamente 30 ciclos según sea el caso.<sup>22,12</sup>

### **2.9.2.3 Técnica de inmunofluorescencia (IF)**

Es una prueba de diagnóstico serológico que tiene dos variedades principales: a) Inmunofluorescencia directa (IF) aplicada fundamentalmente a la detección de antígenos en una muestra clínica y b) Inmunofluorescencia indirecta (IFI) aplicada a la detección de anticuerpos específicos en el suero

del paciente frente a un determinado antígeno o a la detección de un antígeno en una muestra clínica.

- Inmunofluorescencia directa: sobre un portaobjeto depositamos una muestra en la que buscamos la presencia de un determinado antígeno. Añadimos un suero específico del antígeno problema marcado con isotiocianato de fluoresceína (conjugado). Si el antígeno problema se encuentra presente en la muestra, se une el conjugado. En caso contrario el conjugado se elimina con un lavado del portaobjeto.
- Inmunofluorescencia indirecta: sobre un portaobjeto que lleva pegado un antígeno conocido, se añade el suero problema. Si éste contiene anticuerpos específicos, se unen al antígeno. Los anticuerpos del suero no específicos del antígeno del portaobjeto se eliminan mediante un lavado. Posteriormente se añade un suero anti-inmunoglobulina humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (conjugado). El conjugado se une a los anticuerpos específicos o se elimina mediante lavado si no había anticuerpos específicos en el suero.

La lectura de ambas modalidades de IF se hace con un microscopio de fluorescencia cuya luz excita al isotiocianato de fluoresceína haciendo que emita luz fluorescente de color verde. La observación de luz verde fluorescente “tiñendo” un objeto del portaobjeto indica la presencia del antígeno en la muestra o de anticuerpos específicos en el suero, según el caso.<sup>2</sup>

### **2.9.3 Método del Hematocrito**

La información que se obtiene del examen del hematocrito, junto con el examen microscópico de un frotis de sangre teñido con el azul de metileno, proporciona un hemograma rápido y extremadamente útil del paciente. No solo se obtiene el VPC (volumen del paquete celular) sino también un estimado aproximado de la cuenta leucocítica total, así como indicios derivados de las características del plasma.<sup>26, 18</sup>

La cuenta total eritrocítica puede confirmarse a los padecimientos donde la computación de los índices eritrocíticos son muy necesarios, porque el VPC es

un indicador adecuado del estado eritrocítico del paciente. El VPC tiene la mayor sensibilidad y reproducibilidad de las diferentes técnicas:

- Error de VPC: 1 a 2%
- Error en la cuenta eritrocítica: hasta del 40%

Para reducir el error en la cuenta manual, deben contarse miles de células.

Aún en las cuentas electrónicas, con frecuencia se encuentran errores.

- Error en la hemoglobina: del 2 al 50% <sup>26</sup>

Las cuentas de leucocitos aproximadas pueden hacerse de la capa flogística que se encuentra en la parte superior de la capa de eritrocitos en paquete en el tubo de Wintrobe.

- El primer milímetro es igual a 10000 y cada 0.2 de mm siguiente es igual a 2000 leucocitos/microlitro.
- Esta aproximación no debe usarse como sustituto de la cuenta leucocítica total, pues es posible confundirse con una trombocitosis marcada, o con la variabilidad en el tamaño de las células. <sup>18, 26</sup>

### 2.9.3.1 Valores normales

Animales jóvenes: la edad influye en la amplitud del VPC normal y en muchos casos no se recomienda interpretar el VPC de los animales jóvenes usando las variaciones normales para adultos. <sup>18</sup>

Bovino: el VPC y la hemoglobina son más altos al nacimiento, pero se reducen tan pronto como el ternero empieza a amamantarse. Cuando el ternero se encuentra en período de crecimiento y la ingesta de hierro es baja, el VPC y la hemoglobina pueden continuar declinado por varias semanas. <sup>26</sup>

Edad	VPC (%)	Hemoglobina
Al nacimiento	42	13.0
A la semana	35	11.0
2 meses	32	10.5
4 meses	35	11.0
24 meses	35	11.0

**Cuadro 1. Valores de hematocrito y hemoglobina por edad**

## 2.10 PROFILAXIS

El control y erradicación de las tripanosomosis en áreas endémicas es un problema actualmente sin solución. En primer lugar, porque un tratamiento quimioprofiláctico adecuado, representaría un coste tan elevado que no sería rentable esta actuación. En segundo lugar, la pronta aparición de resistencia a los fármacos desarrollados, desaconseja dicha práctica.<sup>5</sup>

Hoy día, se estudia la posibilidad de nuevos compuestos farmacológicos, el desarrollo de vacunas suficientemente protectoras y muy en especial, la actuación genética sobre la lucha contra esta enfermedad, consiguiendo razas de animales, si no resistentes, al menos, con buena tolerancia hacia la tripanosomosis.<sup>5</sup>

En la profilaxis quimioterapéutica, se pueden usar Diaminazeno aceturato (3-4 mg/kgpv SC o IM) o Sulfato de quinapirina (5 mg/kgpv).<sup>5</sup>

Sería fundamental el sacrificio de animales infectados, ya sea con enfermedad aparente o inaparente. El problema en este caso es que, normalmente sería necesario realizarlo en zonas económicamente muy deprimidas, con lo que el sacrificio de animales puede incrementar el problema de obtención de proteínas.<sup>5,8</sup>

Uno de los mejores medios a nuestro alcance hoy en día, si no para eliminar, sí para paliar la presentación de la infección, es la lucha contra los vectores del parásito (glosinas, tábanos, etc.).<sup>5</sup>

Por último, debemos actuar sobre los sistemas de explotación, haciéndolos más racionales mediante técnicas de pastoreo rotacional, mejora de praderas, etc., al igual que contra los animales silvestres que se comportan como fuentes de parásitos, matándolos y destruyéndolos, con objeto de evitar el contagio de nuevos vectores.<sup>5,8</sup>

Sin duda, en un futuro se planteará la solución con el desarrollo de métodos inmunológicos de protección, o mediante manipulación genética que lleve a la

obtención de animales no receptivos a padecer la enfermedad, pero eso, hoy en día, no es sino un deseo y un sueño de muchos investigadores.<sup>8</sup>

## 2.11 ENFERMEDAD DE CHAGAS

**Sinónimo:** Tripanosomosis americana, enfermedad de Chagas-Maza.

**Etiología:** *Trypanosoma cruzi*, un protozoo flagelado, provisto de membrana, cuyo ciclo evolutivo es complejo y sufre varias transformaciones tanto en el huésped vertebrado como en el vector triatomíneo.

**Distribución geográfica:** la infección por *T. cruzi* ocurre desde la zona sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile. Se han encontrado vectores y reservorios selváticos infectados o solo triatomíneos selváticos en la mayor parte de la región del Caribe, que antes se consideraba libre de la infección. La infección chagásica no se ha comprobado fuera del continente americano.

**Ocurrencia en el hombre:** la enfermedad de Chagas es esencialmente un problema del sur de México, América Central y del Sur.<sup>1</sup>

La prevalencia más alta de la enfermedad se encuentra en las áreas rurales y periurbanas, pero su distribución es desigual y depende de que el vector triatomíneo sea o no sea domiciliario.

La importancia de la enfermedad de Chagas en Salud Pública ha sido señalada en repetidas ocasiones, y radica sobre todo en la frecuencia de las cardiopatías que produce en los enfermos crónicos. En algunas áreas, la enfermedad es la causa más frecuente de miocardiopatías e incluso de muertes.

**Ocurrencia en los animales:** la infección natural se ha encontrado en más de 100 especies de mamíferos, tanto domésticos como silvestres. Sin embargo, por dificultades en la identificación, no hay seguridad de que todas las cepas aisladas correspondan a *T. cruzi*. Varias especies de animales silvestres sirven de reservorio en diferentes situaciones ecológicas. La infección natural se ha comprobado en gran número de especies de animales silvestres. Si bien prácticamente todo mamífero en contacto con los vectores infectados puede adquirir la infección, no todas las especies animales tienen la misma importancia en el mantenimiento de la enzootia chagásica silvestre.<sup>1</sup>

## 2.12 ENFERMEDAD DEL SUEÑO

**Sinonimia:** Tripanosomosis africana; tripanosomosis gambiense (por *T. brucei gambiense*); tripanosomosis rodesiense (por *T. brucei rhodesiense*)

**Etiología:** dos subespecies de *Trypanosomas brucei*: *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, protozoarios flagelados, provistos de membrana ondulante y transmitido por moscas del genero *Glossina* (Tse Tsé).

Las dos subespecies “humanas” (*T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*) no se pueden distinguir morfológicamente entre sí, ni de *T. b. brucei*, patógeno de los animales domésticos de África pero que no infecta al hombre. La similitud morfológica de estos agentes ha dificultado en gran parte las investigaciones epidemiológicas.<sup>1</sup>

**La enfermedad en los animales:** las infecciones por *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense* suelen ser subclínicas en los animales domésticos y silvestres.

Las especies importantes en la patología bovina de África son *T. congolense* y *T. vivax* que no infectan al hombre. Otra tripanosomosis que ocurre en África y también fuera de este continente se debe a *T. evansi*, que es transmitida por tabánidos.<sup>1</sup>

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 GENERALIDADES**

##### **3.1.1 Ubicación Geográfica**

La investigación se llevó a cabo en 11 unidades productivas de bovinos, ubicadas en el Distrito de Riego del Valle de San Andrés, Departamento de La Libertad, El Salvador, las cuales fueron georeferenciadas con equipo GPS (Figura A1).

La fase de laboratorio se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), de la Universidad de El Salvador.

##### **3.1.2 Duración de la Investigación**

La investigación se realizó durante los meses de Marzo de 2007 a Noviembre de 2007, dividida en dos fases: una de campo (toma de muestras) y otra de laboratorio; las cuales se fueron realizando simultáneamente.

#### **3.2 TIPOS DE UNIDADES PRODUCTIVAS BOVINAS**

El estudio fue realizado en unidades productivas lecheras, en las cuales el hato se mantiene de forma estabulada, y las razas predominantes en dichas unidades son Holstein, Brown Swiss y encastes de las razas anteriores con Brahman.

#### **3.3 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA**

Para determinar el tamaño de la muestra nos auxiliamos del “Programa de Cálculo del Tamaño Muestral para la Estimación de la Prevalencia”, de **T&T**, empresa española/inglesa dedicada al diseño, realización y análisis estadístico de experimentos con animales. A efectos de maximizar la confiabilidad y exactitud del estudio se utilizó como prevalencia estimada el 50% y el nivel de

confianza del 99%. El número de muestra obtenido con estos valores corresponde al 37% de la población.<sup>30</sup>

Población: 1,132 animales

Confianza: 99%

Precisión: 5%

Prevalencia: 50%

**Numero de muestras = 419 animales.**

Debido a los cambios de la estructura etérea de las unidades productivas en estudio, solamente se recolectaron **335 muestras sanguíneas.**

### **3.4 METODOLOGÍA DE CAMPO**

#### **3.4.1 Inspección y Encuestas**

Se realizaron inspecciones en cada unidad productiva, con el fin de realizar un reconocimiento de las instalaciones e identificar el área donde se efectuaría el manejo de los animales al momento de la toma de muestra (manga, sala de ordeño, etc).

Simultáneamente se realizó una encuesta a propietarios o encargados de las unidades productivas (Figura A2) con el objetivo de recopilar datos e información general del manejo del hato y número de animales del mismo.

Realizado lo anterior se estableció la fecha y hora de la toma de muestra, así como la calendarización de las actividades a desarrollar.

Para llevar a cabo la toma de muestras se acordó con los encargados del lugar lo siguiente:

- Muestrear después del primer ordeño o durante las primeras horas de la mañana, para provocar el menor estrés posible.
- Establecer la fecha y hora de toma de muestra, y se solicitó tener listos los animales, para así reducir al mínimo el tiempo de muestreo, ya que

sólo se contaban con 4 horas hábiles para el procesamiento de las muestras.

- Contar con colaboración de los encargados de la ganadería para el manejo de los animales al momento de la toma de muestra, con el objetivo de evitar el estrés y también reducir el tiempo de muestreo.

### **3.4.2 Toma de muestra sanguínea**

Para este estudio se recolectaron 335 muestras sanguíneas de un total de 1,135 bovinos provenientes de 11 unidades productivas lechera ubicadas en el Distrito de Riego del Valle de San Andrés, departamento de La Libertad.

Se decidió trabajar con los siguientes estratos: novillas, terneras, vacas productoras, horas, toros y bueyes (Cuadro A1).

El procedimiento durante la toma de muestra (sanguínea), fue el siguiente:

- Los animales fueron seleccionados al azar y sujetados adecuadamente para su manipulación.
- Posteriormente se realizó la limpieza y desinfección (agua y alcohol 90%) del área de punción para obtención de la muestra. (Figura A3)
- Por punción de la vena coccígea se obtuvieron aproximadamente 5ml de sangre, utilizando jeringas estériles descartables de 5ml con aguja de 21 x 1 ½. (Figura A4)
- Inmediatamente obtenida la muestra se depositaba una gota de sangre sobre un portaobjeto para realizar frotis sanguíneo. (Figura A5)
- Se colocó una gota pequeña sobre un portaobjeto limpio. Se tomó un segundo portaobjeto, se situó sobre uno de los extremos del primero formando un ángulo aproximado de 30° y se puso en contacto con la gota de sangre. Cuando la sangre se distribuyó a lo largo del borde del portaobjeto inclinado, se desplazó, conservando la inclinación, el otro extremo del portaobjeto horizontal. La sangre formó una monocapa fina y homogénea. Se secó rápidamente abanicando el portaobjetos en el aire. (Figura A6)
- El resto de la muestra se depositaba en tubos de ensayo con tapón de hule con anticoagulante.(Figura A7)

- Tanto el frotis como el tubo se identificaron con un número correlativo correspondiente al número del animal. (Figura A8)
- Las muestras obtenidas eran almacenadas y transportadas al laboratorio en una hielera a temperatura de refrigeración. (Figura A9)

### **3.4.3 Materiales y Equipo de campo**

- Jeringas descartables con capacidad para 5 ml con aguja de 21 x 1 ½
- Agujas 18x1 ½
- Alcohol
- Algodón
- Bolsas plásticas grandes
- Botas de hule
- Overall
- Tirro
- Gelatinas (refrigerantes)
- Gradillas para tubos de ensayo
- Hielera
- Lazos para sujeción
- Papelería en general
- Bolígrafos
- Tubos de ensayo
- EDTA
- Un galón de agua
- Vehículo
- Porta objetos
- Atomizadores para limpieza (agua y alcohol)
- Papel toalla
- Cicatrizante
- Mesa portátil

## **3.5 METODOLOGÍA DE LABORATORIO**

### **3.5.1 Técnica de Medición de Hematocrito**

Los eritrocitos, que tienen una densidad específica más elevada, se separan por medio de centrifugación a gran velocidad de los otros elementos, que aparecen desde la parte superior hasta el fondo en el siguiente orden:

- Plasma: capa amarillenta que se separa de las que contiene células.
- Capa flogística: capa blanca o gris, en ocasiones rojiza.
- Eritrocitos: capa de color rojo oscuro que se separa de la capa flogística por medio de una línea oscura producida por la reducción de la hemoglobina del contacto con los leucocitos.<sup>26</sup>

#### **3.5.1.1 Materiales**

- Capilares sin heparina
- Plastilina
- Guantes de látex

#### **3.5.1.2 Equipo**

- Microcentrífuga
- Tabla para lectura de microhematócrito
- Gabacha blanca

#### **3.5.1.3 Metodología**

Una vez en el laboratorio la muestra fue homogenizada y se recolectó con capilar sin heparina, el cual posteriormente se selló en un extremo con plastilina. Se procedió a su identificación y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos. (Figura A12)

Los capilares fueron medidos utilizando una tabla para microhematocrito, y los valores obtenidos se compararon con los ya establecidos (Figura A13).

### **3.5.2 Método de Woo (Centrifugación en tubos microcapilares)**

El método de Woo se basa en los componentes sanguíneos, ya que se observa que la mayor parte de los leucocitos se sedimentan a una velocidad más lenta que los eritrocitos, debido a que su gravedad específica es un poco menor que la de los eritrocitos, y se forma la capa Buffy (capa de leucocitos) entre la capa roja, mucho más gruesa de las células y la columna del plasma. La gravedad específica de los tripanosomas, que se encuentran libres en el plasma, es también menor que la de los eritrocitos, y es por esto que ellos tienden a concentrarse en el límite del plasma y la capa Buffy, así como también en la propia capa de Buffy (esto dependerá de la especie).<sup>11, 21, 22</sup>

En casos positivos se observaran tripanosomas móviles en el fondo de la columna de plasma, inmediatamente arriba de la capa de leucocitos. Se observaran los tripanosomas con mayor claridad empleando el objetivo 40x.<sup>11</sup>

#### **3.5.2.1 Materiales**

- Gradillas para tubos de ensayo
- Capilares sin heparina
- Porta objetos
- Tirro
- Papel toalla
- Plastilina
- Guantes de látex

#### **3.5.2.2 Equipo**

- Microcentrífuga con capacidad para 24 microcapilares
- Microscopio compuesto
- Gabacha blanca

#### **3.5.2.3 Metodología**

Los tubos capilares (dos por muestra) se fijaron en un portaobjeto por sus extremos con cinta adhesiva y observados al microscopio con el objetivo 40x para detectar el posible movimiento de tripanosomas. (Figura A14)

### **3.5.3 Técnica de Tinción de Frotis Sanguíneo**

La tinción Giemsa es un método habitual para el examen de frotis sanguíneo, que permite la coloración de diferentes zonas con alto contenido de ADN. Este permite distinguir perfectamente en microscopio óptico las diferentes estructuras de microorganismos y componentes sanguíneos.

Este método a través de la observación directa del parásito por medio de microscopio, permite identificar las especies de *Trypanosoma* por sus características morfológicas.<sup>11, 22, 21</sup>

#### **3.5.3.1 Materiales y reactivos**

- Portaobjetos
- Metanol
- Agua desmineralizada
- Solución Giemsa
- Solución Búffer
- Tirro
- Papel toalla

#### **3.5.3.2 Equipo**

- Bandeja para coloración de láminas
- Pizeta
- Gotero
- Microscopio compuesto
- Gabacha blanca

#### **3.5.3.3 Metodología**

En el laboratorio los frotis fueron fijados con metanol por 3 minutos, luego se lavó el exceso con agua desmineralizada. Después se agregó el colorante por un tiempo de 30 minutos (Figura A15), se eliminó el exceso con agua desmineralizada y se secó al ambiente (Figura A16). Realizado este proceso se procedió a su observación directa al microscopio utilizando el método en zigzag, con los objetivos 40x y 100x. (Figura A17)

## 4. RESULTADOS

### 4.1 HEMATOCRITO

Al medir el valor de hematocrito de las 335 muestras sanguíneas se obtuvo un promedio general de 30.47, con una desviación típica de 4.65. Evaluado el hato por estratos se obtuvieron los siguientes resultados:

<b>ESTRATO</b>	<b>MEDIA</b>	<b>DESVIACIÓN TÍPICA</b>
Producción	30.26	3.87
Horras	32.59	5.10
Novillas	29.20	4.05
Terneras	30.86	6.16
Toros	29.83	5.15
Buey	31	-

**Cuadro 2. Valores de hematocrito por estrato**

De las 23 muestras sanguíneas que resultaron positivas por el método de Woo, se obtuvo un valor promedio de hematocrito de 29.13, con una desviación típica de 4.00. (Cuadro A2)

### 4.2 MÉTODO DE WOO (MICROCENTRIFUGACIÓN)

De las 335 muestras, 23 resultaron positivas y 312 negativas. (Gráfico A1)

### 4.3 TINCIÓN DE FROTIS SANGUÍNEO

Las 335 muestras resultaron negativas por este método. (Gráfico A2)

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta investigación, de las 335 muestras evaluadas solamente 23 fueron positivas por el método de Woo, correspondiendo al 6.86% del total de muestras, mientras que por frotis sanguíneo no se obtuvieron resultados positivos. Lo anterior se explica porque un capilar contiene aproximadamente 70 microlitros de sangre que experimentan un proceso de concentración, en tanto, que en un frotis no se utilizan más de 8 - 10 microlitros en un portaobjeto lleno. Además, en los capilares que resultaron positivos se encontró movimiento de 1 ó 2 trypanosomas, lo que indica una concentración extremadamente baja, por lo cual solamente podríamos encontrar un trypanosoma en varios frotis.<sup>13</sup>

Por otro lado, de las 11 unidades productivas estudiadas se observaron resultados positivos en 4 de ellas, lo que equivale a más de la tercera parte de las unidades en estudio, las cuales guardan una íntima relación geográfica. (Gráfico A3)

Cabe destacar, que de las 23 muestras positivas diagnosticadas por el método de Woo, 5 de ellas (21.74%) pertenecen a la misma unidad productiva en la cual en Diciembre del 2006, la División de Sanidad Animal del MAG diagnosticó oficialmente la presencia de *Trypanosoma spp.*

El nivel promedio del hematocrito de las muestras se encuentra por debajo del promedio normal (35), presentando un mismo comportamiento los diferentes estratos establecidos; además dentro de los mismos estratos, al contrastar el de los animales positivos y los animales negativos, los primeros mostraban una tendencia a ser menor; la excepción fue en el estrato de las productoras. Sin embargo, estas diferencias al ser evaluadas por la prueba de "T" Student, estadísticamente no son significativas. (Gráfico A4)

Independientemente de la presencia de tripanosoma, el 81.1% del total de la muestra presentó un hematocrito menor al promedio. Ninguna de las Unidades Productivas superó el promedio normal. En base a lo anterior, la presencia de *Trypanosoma spp.* no afecta el valor del hematocrito de los bovinos en estudio. Se debe tomar en cuenta que para este estudio no se consideraron elementos clínicos, ni se realizó una anamnesis completa de los bovinos muestreados.

En esta investigación se logró determinar la existencia de cuatro focos, aunque se estima que su preponderancia es mayor debido a que la sensibilidad de los métodos de laboratorio utilizados permiten detectar menos del 50% de bovinos infectados. A esto se suma la transmisión vectorial que supone una mayor extensibilidad de la parasitosis.

En base a las encuestas realizadas en el 72.72% de las unidades productivas se realiza control de vectores, aunque no sistemáticamente, orientado principalmente a la eliminación de ratas y moscas. (Gráfico A5)

## 6. CONCLUSIONES

- Los resultados positivos por el método de Woo determinan que en el Distrito de Riego del Valle de San Andrés, existe la presencia de *Trypanosoma spp.* en bovinos, diagnosticado por primera vez en el país por dicho método.
- En esta investigación no se comprobó una relación entre la presencia de *Trypanosoma spp.* y el nivel de hematocrito de los bovinos estudiados.
- Los bovinos de la zona estudiada presentaron un hematocrito menor del promedio normal de referencia (35).
- En este estudio, el método de Woo resultó ser más sensible que la coloración de frotis sanguíneo; con la desventaja que el método de Woo no permite la determinación de la especie presente, contrario a la coloración de frotis sanguíneo.
- En la zona no existe un verdadero control de vectores, encaminado a prevenir el contacto insecto-bovino.

## 7. RECOMENDACIONES

- Realizar otras investigaciones que permitan establecer la o las especies de *Trypanosoma* presentes en la zona en estudio, y a la vez establecer también su distribución y extensibilidad en el país. PCR
- Tomar en cuenta anamnesis y sintomatología clínica compatible con tripanosomosis en futuras investigaciones, con el fin de incrementar las posibilidades de identificar el agente etiológico.
- Ejecutar estudios sobre los posibles vectores que puedan estar interviniendo en el desarrollo y transmisión de tripanosomas en El Salvador.
- Realizar estudios más exactos para determinar parámetros sanguíneos normales en bovinos, que puedan servir de referencia para estudios posteriores.
- En la transmisión de enfermedades hematozoáricas, la prevención debe ir orientada al control de los vectores.
- Establecer métodos diagnósticos para la detección de tripanosoma en los protocolos rutinarios en el Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario de la DGSVA – MAG.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ACHA, P.; SZYFRES, B. 1988, Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales, segunda edición, Estados Unidos, OPS (Organización Panamericana de la Salud), p. 591-610
2. BENTI, R.; GIL, J. Zaragoza España. Inmunofluoresencia. Servicio de imágenes medicas. Consultado en noviembre 2007. Disponible en el World Web: [www.imagenmed.com/especiales/ie9/if.html](http://www.imagenmed.com/especiales/ie9/if.html)
3. BOLIVAR, A. GARCIA-LUGO, P. Venezuela 2006; Detección subclínica por *T. vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Merida. Boletín de Malariología y Salud Ambiental. Consultada septiembre 2007. Disponible en el World Web: [www.iaesp.edu.ve/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=352](http://www.iaesp.edu.ve/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=352)
4. Comité de Enfermedades Exóticas de la Asociación de Sanidad Animal de Estados Unidos, 1984, Enfermedades Exóticas de los Animales su prevención, diagnóstico y prevención, México, p. 367-389
5. CORDERO DEL CAMPILLO, M. 1999, Parasitología Veterinaria, McGraw-Hill Internacional, Madrid, España.
6. COROMOTO ALFARO, FONAIAP (Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Monagas), 1999, Guía para elaborar un programa sanitario en fincas ganaderas, consultado en julio 2007. Disponible en el World Web: [www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd64/texto/guia.htm](http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd64/texto/guia.htm)
7. DALA SIERRA, E., Honduras 1995, Primera descripción de Trypanosoma en Honduras. Revista médica hondureña volumen nº 63.

Consultada en noviembre del 2007. Disponible en el World Web:  
[cidbimena,desastres,hn/RMH75/pdf/1995/pdf/vol63-1-1995-10.pdf](http://cidbimena.desastres.hn/RMH75/pdf/1995/pdf/vol63-1-1995-10.pdf)

8. E. J. L. Soulsby, 1987, Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos, séptima edición, México, Interamericana, p. 521-551.
9. ESPINOSA, ASO, GONZALES Y RANGEL. Venezuela 1996. Clasificación morfológica de las anemias desarrolladas en bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Veterinaria Tropical. Consultada en octubre 2007. Disponible en el World Web : [www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/VeterinariaTropical/vt2102/texto/eespinoza.htm](http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasCientificas/VeterinariaTropical/vt2102/texto/eespinoza.htm)
10. EVANS, B; VICTORIA, E. M.V. 1983, Estudio y Diagnostico de Tripanosomiasis Bovina en Costa Rica, Tesis Lic. Med. Vet. Costa Rica Universidad Nacional. p.
11. FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS), 1998, The diagnosis, Treatment and Prevention, of African animal, consultado Julio 2007. Disponible en el World Web: <http://www.fao.org/docrep/006/X0413E/X0413E00.htm#TOC>
12. GONZALES, B. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Uso de la Técnica para el diagnóstico de *Trypanosoma evansi* . Red de identificación y diagnostico molecular de hemoparasitos. Consultado noviembre 2007. Disponible en el World Web: [www.reddehemoparasitos.org/protocolos](http://www.reddehemoparasitos.org/protocolos)
13. GUTIERREZ, C. 2007, Tripanosoma en El Salvador (correo electrónico) Granda, España
14. HARWOOD, R; JAMES, M. 1987. Entomología Médica y Veterinaria. Editorial LIMUSA. Mexico D.F.

15. ILRAD (The International Laboratory for Research on Animal Diseases). Nairobi, Kenya 1990. Annual Report of the International Laboratory for Research on Animal Diseases. Consultada en septiembre 2007. Disponible en el World Web: [www.ilri.org/.../Fulldocs/Illrad90/Trypano.htm](http://www.ilri.org/.../Fulldocs/Illrad90/Trypano.htm)
16. JOSE LUIS IMBERT PALOFOX. México 2003. Tripanosomiasis americana o mal de Chagas. Otra enfermedad de la pobreza. Revista Ciencia y Cultura Elementos, volumen #10. Consultada en noviembre 2007. disponible en el World Web: [www.elementos.buap.mx/num49/htm/13.htm](http://www.elementos.buap.mx/num49/htm/13.htm) - 31k
17. MARKELL, VOGEL, JOHN. España 1990. Biología de los protozoos parásitos. Consultada octubre 2007. Disponible en el World Web: [www.uniovi.es/bos/Asignaturas/Parasit/Tema7.htm](http://www.uniovi.es/bos/Asignaturas/Parasit/Tema7.htm) - 41k -
18. MAXINE, M. 1984. Manual de Patología Clínica en Veterinaria, editorial LIMUSA. Mexico D.F.
19. MOSCOS MONTTOYA, L. 1998. Estado actual de la Seroprevalencia de *T. cruzi* en mapaches (*Porcion lotor*) mantenidos cautivos en zoológicos de Guatemala, Universidad de San Carlos Guatemala. p.
20. OCÉANO-CENTRUM, 2001, Manual Merck de Veterinaria, Quinta Edición, Barcelona España.
21. OIE (Organización Internacional de Epizootia), 2004, Manual of Diagnostic, Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, consultado Abril 2007. Disponible en el World Web : [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/a\\_00001.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/a_00001.htm)

22. PERRONE C, TRINA M., 2006, Manual de Laboratorio: Técnicas de Diagnóstico Aplicadas a Hemoparásitos de Interés Veterinario, Venezuela. Consultado en abril de 2007. Disponible en el World Web: [www.reddehemoparasitos.org](http://www.reddehemoparasitos.org)
23. QUISPE, P.; CHAVEZ, A. Venezuela 2000; Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de cuatro distritos de la provincia de Coronel Portillo, Ucayali . Revista Científica Veterinaria Peruana. Consultada en junio 2007. Disponible en el World Web: [www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172003000200011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172003000200011&script=sci_arttext)
24. REYES KNOKE, M., M.V., M. Sc., 1983, Evolución y Logros del Departamento de Investigación Veterinaria, MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería), El Salvador, Centro de Desarrollo Ganadero. P. 35.
25. RODRÍGUEZ, QUIÑÓNEZ, RAMÍREZ, RUIZ. México 2002. Presencia del genero Trypanosma en la garrapata *Boophilus microplus* en el tropico mexicano. Consultado en mayo 2007. Disponible en el World Web: [www.uady.mx/~biomedic/revbiomed/pdf/rb031417.pdf](http://www.uady.mx/~biomedic/revbiomed/pdf/rb031417.pdf)
26. SCHALM, O. 1964. Hematológica Veterinaria. Editorial Hispano Americana. Mexico
27. TAFUR, M.; CHAVEZ, A.; CASAS, E.; SERRANO, E. Peru 2000; Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de selva alta en la provincia de Chachapoyas, Amazonas. Revista Científica Veterinaria Peruana. Consultado junio 2007. Disponible en el World Web: [www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172002000200015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S160991172002000200015&script=sci_arttext)
28. TAMASAUKAS, R.; ROA, N.; COBO, M. Maracibo diciembre 2006, Revista Científica; Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en Búfalos

(*Bubalis bubalis*), en Dos Fincas del Estado Guárico, Venezuela. Consultado Agosto 2007. Disponible en el World Web: [www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S079822592006012000002&lng=es&nrm=iso](http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S079822592006012000002&lng=es&nrm=iso)

29. TAVARES, L.; ELEIZALDE, M.; BETHENCOURT, A. Elisa para el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina. Red de identificación y diagnóstico molecular de hemoparasitos. Consultado noviembre 2007. Disponible en el World Web: [www.reddehemoparasitos.org/protocolos/ELISA.pdf](http://www.reddehemoparasitos.org/protocolos/ELISA.pdf)

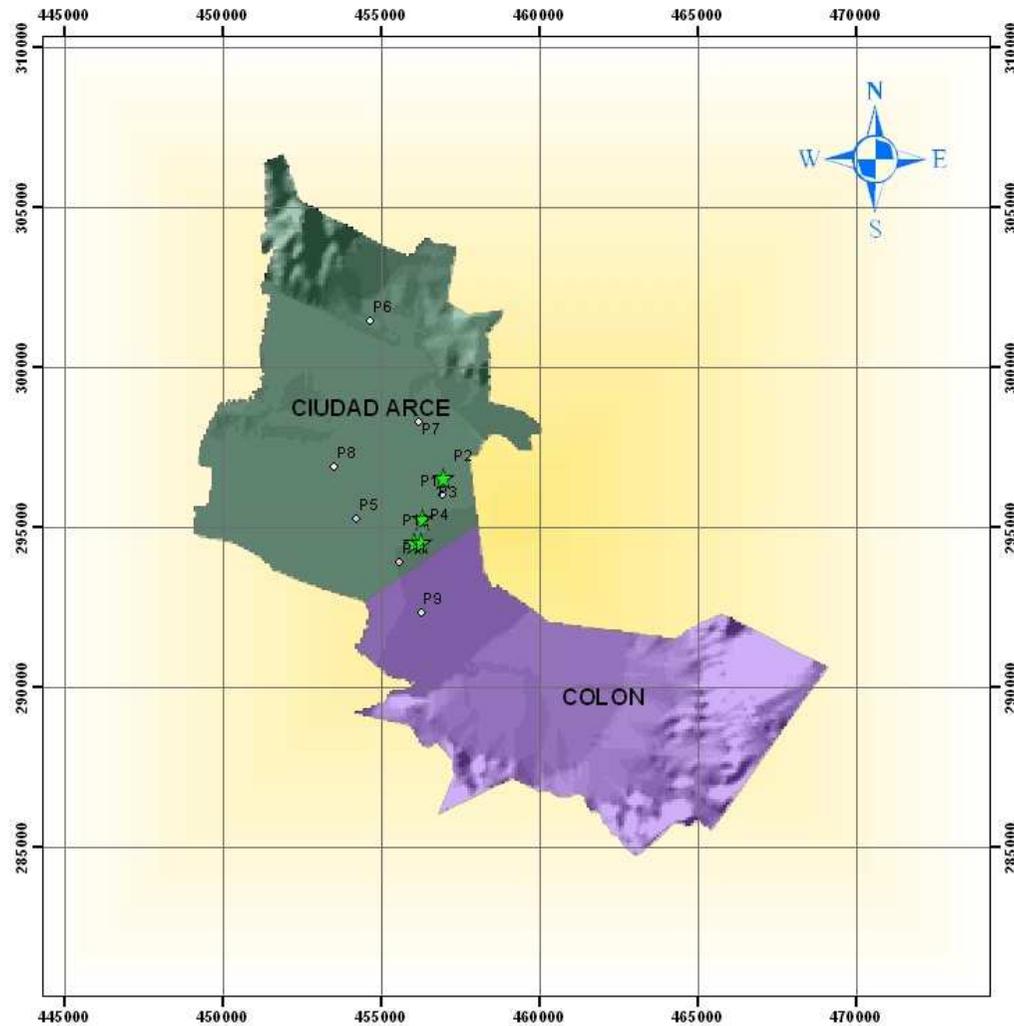
30. TESTS AND TRIALS, 2001, Precisión y Exactitud, España, consultado Mayo 2007. Disponible en el World Web : [testsandtrials.com/recursos.htm](http://testsandtrials.com/recursos.htm)

31. TORO BENITEZ, M. Instituto de Investigaciones Veterinaria. CENIAP. Maracay. Edo. Aragua, 1987, Tripanosomiasis animal: Diagnóstico y Control, consultado abril 2007. Disponible en el World Web: [www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd25/texto/tripanosomiasis.htm](http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/FonaiapDivulga/fd25/texto/tripanosomiasis.htm)

32. WIKIPEDIA, España 2007, Trypanosoma evansi, consultados junio 2007. Disponible en el World Web: [es.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma\\_evansi](http://es.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_evansi).

# **ANEXOS**

# UBICACION GEOGRAFICA DE LAS GRANJAS EN ESTUDIO



Mapa Elaborado por:  
**Manuel Batres Jimenez**  
**Natalia Amaya Martinez**  
**Mario Garcia Constantino**

Mapa sin escala

## Figura A2

### FORMULARIO PARA GANADERIAS

Nombre de la propiedad: \_\_\_\_\_  
Propietario: \_\_\_\_\_  
Dirección: \_\_\_\_\_  
Tel.: \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

Ubicación de la finca:  
Departamento: \_\_\_\_\_  
Municipio: \_\_\_\_\_  
Cantón o Caserío: \_\_\_\_\_  
Coordenadas: Long: \_\_\_\_\_  
UTM: \_\_\_\_\_  
Altura: \_\_\_\_\_

#### Características de la Explotación

Finalidad:

Leche ( )  
Carne ( )  
Mixta ( )

Tipo de crianza:

Estabulada ( )  
Semiestabulada ( )  
Pastoreo ( )

#### Explotación de ganado

Clasificación	Vacas	Novillas	Horro	Terneros	Toros	Bueyes
Numero						
Total:						

Plan profiláctico: Si ( ) No ( )

Que aplican ? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Se han dado casos de Mortalidad dentro de su propiedad?

Si ( ) Cuantos?\_\_\_\_\_ No ( )

Tratamiento Médico o farmacológico de forma rutinaria:

Contra que padecimiento o enfermedad? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Que tipo de medicamento o fármaco? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Se envían muestras de sangre al laboratorio? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Por qué motivo? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Visita veterinaria:

La propiedad es visitada por un Medico Veterinario: Si ( ) No ( )

Con que frecuencia hace las visitas? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Control de Vectores? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Productos utilizados: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



**Figura A3.**  
**Limpieza y desinfección de zona de punción**



**Figura A4.**  
**Obtención de muestra sanguínea**



**Figura A5.**  
**Colocación gota de sangre en lámina**



**Figura A6.**  
**Extendido gota de sangre en lámina**



**Figura A7.**  
**Deposición de muestra sanguínea en tubo**



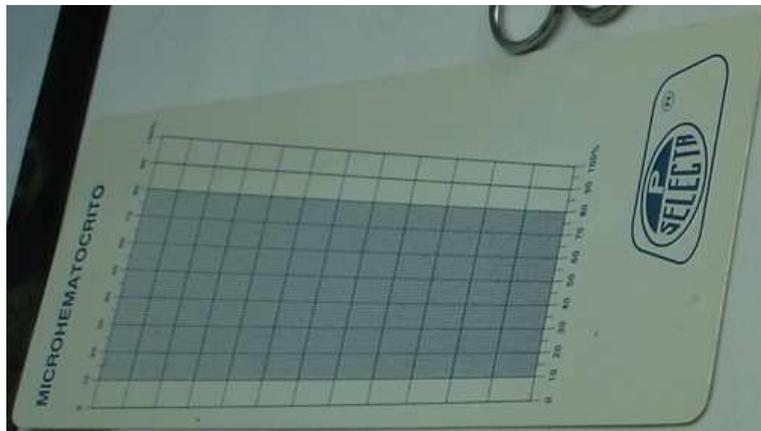
**Figura A8.**  
**Identificación de muestras**



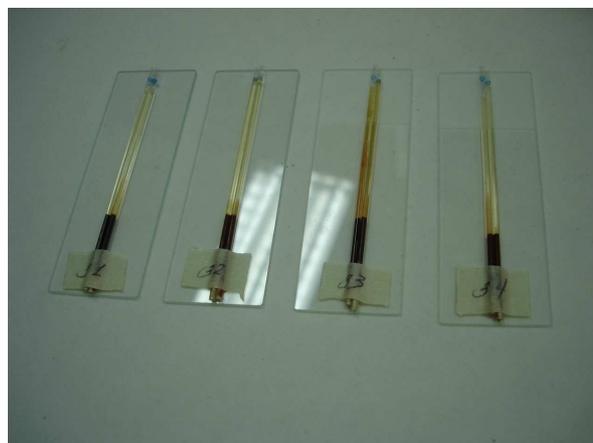
**Figura A9.**  
**Transporte de muestras**



**Figura A10**  
**Microcentrifuga**



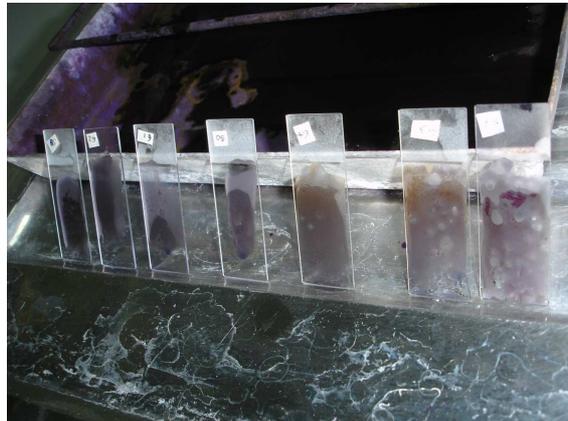
**Figura A11**  
**Tabla lectura de microhematocrito**



**Figura A12**  
**Microcapilares en lámina para observación**



**Figura A13**  
**Coloración de frotis sanguíneo**



**Figura A14**  
**Secado de frotis sanguíneo**



**Figura A15**  
**Observación frotis sanguíneo al microscopio**

# **CUADROS**

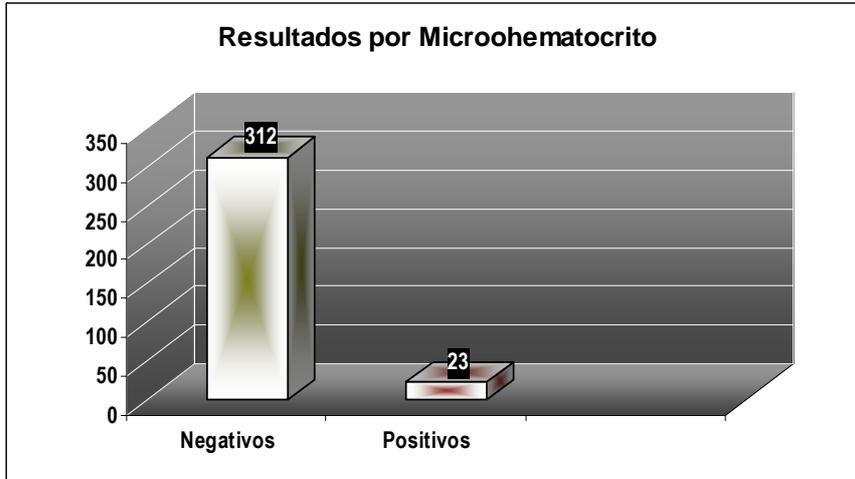
GANDERIAS	N° DE ANIMALES A MUESTRIAR EN C/ PROPIEDAD						TOTAL
	VACAS EN Px	VOVILLAS	G. HORRO	TERNERAS	TOROS	BUEYES	
1	15	15	6	6	1	0	43
2	24	10	4	13	1	1	53
3	18	7	3	6	1	0	35
4	0	4	0	0	0	0	4
5	35	17	7	6	0	0	65
6	10	4	2	3	1	1	21
7	7	4	6	9	0	1	27
8	28	15	7	2	0	0	52
9	22	16	8	9	1	0	56
10	18	18	0	0	0	0	36
11	11	5	5	4	1	1	27
<b>TOTAL</b>	<b>188</b>	<b>115</b>	<b>48</b>	<b>58</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>419</b>

**Cuadro A1**  
**Número de animales a muestrear por unidad productiva y por estrato**

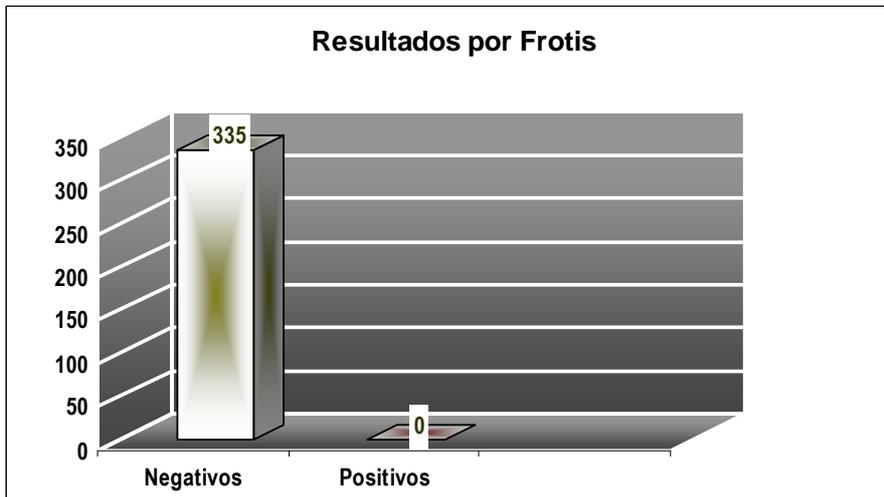
N	Válidos	23
	Perdidos	0
Media		29,1304
Mediana		30,0000
Moda		31,00
Desv. típ.		4,00346
Varianza		16,02767
Mínimo		23,00
Máximo		37,00

**Cuadro A2**  
**Valores estadísticos de muestras positivas**

# GRÁFICOS



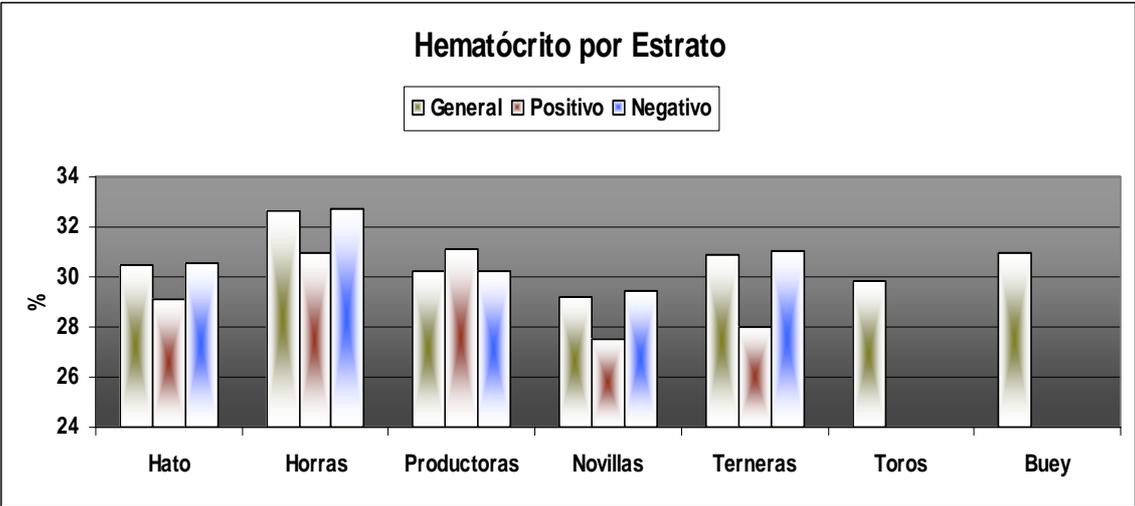
**Grafico A1**  
**Resultados por el método de Woo (microhematocrito)**



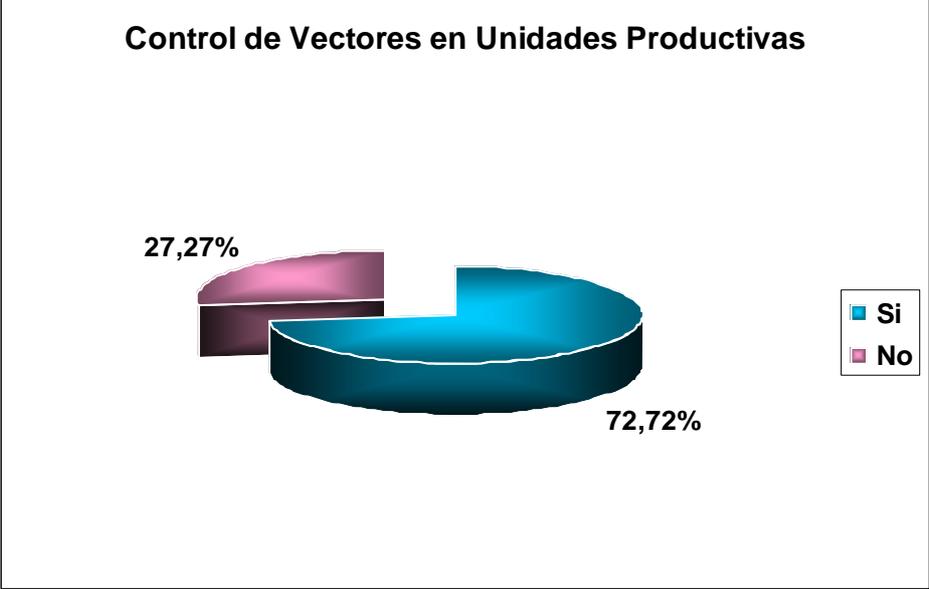
**Grafico A2**  
**Resultados por frotis sanguíneo**



**Grafico A3**  
**Porcentaje unidades productivas positivas y negativas**



**Grafico A4**  
**Valores de hematocrito por estrato**



**Grafico A5**  
**Control de vectores en unidades productivas**