



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA.
FACULTAD DE CIENCIAS.
ESCUELA DE BIOLOGÍA.**

**ENSAYOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Trypanosoma equiperdum*
UTILIZANDO UNA ENZIMA *Taq* POLIMERASA DE PRODUCCIÓN NACIONAL.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Rosamar O. Lugo B., como requisito parcial para optar al título de: Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. Yenis Pérez.

CARACAS, VENEZUELA.

mayo, 2019

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DE LA Br. ROSAMAR OSCARINA LUGO BELLO**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Rosamar Oscarina Lugo Bello, C.I: 20.005.317, titulado "**Diagnóstico molecular de *Trypanosoma equiperdum* utilizando una enzima *Taq* polimerasa de producción nacional**", para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que el trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

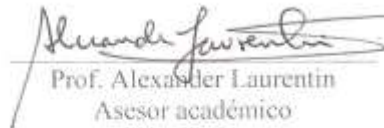
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, a los veintitrés días del mes de mayo del año dos mil diecinueve, dejando constar que el profesor Alexander Laurentin actuó como Asesor Académico y como Coordinador del jurado examinador.



Prof.^a Victoria Navas
Jurado



Prof.^a Cristina Sanoja
Jurado



Prof. Alexander Laurentin
Asesor académico
Coordinador



Prof.^a Yenis Gladinex Pérez
Tutora

AGRADECIMIENTOS.

- ✓ A mis padres, que siempre estuvieron ahí para motivarme y apoyarme incondicionalmente a lo largo de este camino.
- ✓ A mis hermanos, sobrinos, abuelos, tíos y primos, por estar siempre y creer en mí.
- ✓ A la prof Marisa, por haberme recibido con los brazos abiertos como estudiante en el laboratorio e introducirme en el mundo de la investigación, y sacar tiempo para mí en sus días tan ajetreados.
- ✓ A la prof Gladinex, por haberme adoptado y brindado su ayuda para sacar este proyecto adelante de la mejor manera posible.
- ✓ Al Dr. Jacobus De Waard, del Instituto de Biomedicina, por la donación de la *Taq* utilizada en este trabajo
- ✓ Al personal del Bioterio-USB, Luis y José, por la ayuda ofrecida con los animales utilizados para llevar a cabo este proyecto.
- ✓ A mis compañeros y amigos del laboratorio, Eliezer, Naybeth y el “señor” Nirsén, por haber hecho el camino mucho más ameno y divertido.
- ✓ A todo el pabellón, por todo el tiempo compartido, la ayuda ofrecida, los almuerzos eternos, las tardes de tortas, risas y té.
- ✓ A mis amigos de la UCV, los que tal, por el apoyo y los momentos compartidos durante todos estos años. ¡POR SUPUESTO QUE LO IBAMOS A LOGRAR!

GRACIAS A TODOS.

RESUMEN.

El *Trypanosoma equiperdum* es causante de una enfermedad de transmisión sexual entre équidos, llamada Durina, la cual posee una amplia distribución a nivel mundial. Es la única tripanosomosis que no se transmite a través de un insecto vector. Debido a que el *T. equiperdum* y el *Trypanosoma evansi* son indistinguibles a nivel morfológico, es pertinente realizar análisis de diagnóstico molecular que permitan diferenciar estos parásitos. Sin embargo, la no disponibilidad de divisas para la adquisición de insumos y reactivos de laboratorio en Venezuela, en particular, la enzima *Taq* Polimerasa importada, representa una gran limitante para la realización de ensayos de diagnóstico molecular. Por lo tanto, en este trabajo se propuso la utilización de una *Taq* Polimerasa nacional recombinante, expresada en *E. coli*, con la finalidad de estandarizar ensayos de PCR para *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1). Se diseñaron cebadores basados en secuencias de cuatro genes del maxicírculo: *nad5*, *cytb*, *cox1* y *12SrRNA*, comprobando que TeAp-N/D1 ha retenido dichos fragmentos en su maxicírculo. Una vez estandarizado el ensayo, se empleó el par de cebadores basado en la secuencia del gen *12SrRNA* del maxicírculo, que presentaron mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de *T. equiperdum*, para analizar un grupo de muestras de provenientes de una infección experimental en caballo, demostrando que la sensibilidad de la técnica de detección de este parásito es elevada durante todo el curso de la infección.

Palabras claves: TeAp-N/D1, maxicírculos, PCR, sensibilidad, especificidad.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Trypanosoma</i> spp.	1
1.2 <i>Trypanosoma equiperdum</i>	2
1.3 Durina: mecanismo de transmisión.	2
1.4 ADN del kinetoplasto de <i>T. equiperdum</i>	5
1.5 Relación filogenética entre las especies pertenecientes a la sección Salivaria.	7
1.6 Diagnóstico de Durina.	9
2. ANTECEDENTES	12
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo general.	19
3.2 Objetivos específicos.	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1 Infección de ratas con <i>T. equiperdum</i>	20
4.2 Activación de la resina DEAE-celulosa.	20
4.2.1 Empaquetamiento de la resina.	21
4.3 Purificación de <i>T. equiperdum</i>	22
4.4 Aislamiento de ADN genómico a partir de parásitos purificados y la evaluación cuantitativa y cualitativa del mismo y de los controles a utilizar.	22
4.5 Diseño de cebadores para marcadores mitocondriales.	24
4.6 Estandarización de la PCR con los cebadores especie específicos.	26
4.7 Comparación de sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular.	28
5. RESULTADOS	32

5.1 Infección de ratas con <i>T. equiperdum</i> , activación de la resina DEAE-celulosa y su empaquetamiento, purificación de parásitos y aislamiento de ADN genómico.....	32
5.2 Comprobación del ADN genómico total extraído a partir de los parásitos purificados.	32
5.3 Estandarización de la PCR con los cebadores especie específicos.....	35
5.4 Comparación de sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular.	43
5.5 Diagnóstico molecular de muestras de ADN de equino infectado experimentalmente.	47
6. DISCUSIÓN.....	51
7. CONCLUSIONES.....	60
8. RECOMENDACIONES.....	61
9. BIBLIOGRAFÍA.....	62

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1: Síntomas clínicos de la Durina.....	5
Figura 2: Morfología típica de un tripomastigote.	6
Figura 3: Esquema del maxicírculo de tripanosomatídeos que señala la ubicación de los genes mitocondriales que lo constituyen.....	7
Figura 4: Relación filogenética entre tres especies de tripanosomas estrechamente relacionadas: <i>T. brucei</i> , <i>T. evansi</i> y <i>T. equiperdum</i>	8
Figura 5: Árbol evolutivo hipotético del subgénero <i>Trypanozoon</i>	9
Figura 6: Países en donde están presentes los principales tripanosomas que afectan a animales.	13
Figura 7: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar integridad del ADN genómico total extraído a partir de parásitos purificados..	33
Figura 8: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad de los ADN genómicos usados como controles durante los ensayos de PCR con los cebadores mitocondriales.....	34
Figura 9: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad de los ADN genómicos provenientes de la infección experimental con TeAp-N/D1.....	35
Figura 10: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores <i>cytb</i>	36
Figura 11: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores <i>cox1</i>	37
Figura 12: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores <i>nad5</i> siguiendo el protocolo de Li y colaboradores (2006).....	38
Figura 13: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR en gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores <i>nad5</i> , siguiendo el protocolo de Li y colaboradores (2006).....	39

Figura 14: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR en gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores <i>nad5</i> , siguiendo el protocolo Sánchez y colaboradores (2015).....	40
Figura 15: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores <i>nad5</i> , siguiendo el protocolo de Sánchez y colaboradores (2015), con una temperatura de hibridación de 55,5°C.....	41
Figura 16: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR en gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores <i>12SrRNA</i> ..	42
Figura 17: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores <i>12SrRNA</i> , con una temperatura de hibridación de 57,6°C.....	43
Figura 18: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida para evaluar la sensibilidad de la PCR con los cebadores <i>cytb</i> , <i>cox1</i> , <i>nad5</i> y <i>12SrRNA</i> ..	44
Figura 19: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida para evaluar la especificidad de la PCR con los cebadores <i>cytb</i> , <i>cox1</i> , <i>nad5</i> y <i>12SrRNA</i> ..	45
Figura 20: Parasitemia y Temperatura del equino a lo largo de toda la infección experimental con <i>T. equiperdum</i> (cepa TeAp-N/D1).....	47
Figura 21: Registro de hematocritos presentado por el equino a lo largo de la infección experimental con <i>T. equiperdum</i> (cepa TeAp-N/D1).....	48
Figura 22: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida para evaluar el diagnóstico, a través de PCR con los cebadores <i>12SrRNA</i> , de las muestras provenientes de la infección experimental con <i>T. equiperdum</i> (cepa TeAp-N/D1).....	49

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Juego de cebadores utilizados para la amplificación por PCR especie específica.	25
Tabla 2. Tamaño estimado de los productos esperados en la PCR y temperatura de hibridación teórica reportada para cada par de cebadores.	25
Tabla 3. Reactivos y concentraciones empleados para cada reacción usando los cebadores <i>cytb</i> , <i>cox1</i> , y <i>12SrRNA</i>	26
Tabla 4. Reactivos y concentraciones empleados para cada reacción usando los cebadores <i>nad5</i>	27
Tabla 5. Cepas empleadas durante los ensayos de especificidad de PCR usando los cebadores mitocondriales.	30

Lista de Abreviaturas.

- ✓ **ADNk**: ADN del kinetoplasto.
- ✓ **ADN**: Ácido desoxirribonucleico.
- ✓ **ADNr**: Ácido desoxirribonucleico ribosomal
- ✓ **ARN**: Ácido ribonucleico.
- ✓ **ARNr**: Ácido ribonucleico ribosomal.
- ✓ **A6**: ATP sintetasa subunidad 6.
- ✓ **CATT**: Test de aglutinación en tarjeta.
- ✓ **cox1**: Citocromo oxidasa subunidad 1.
- ✓ **cytb**: Citocromo b.
- ✓ **dNTPs**: desoxirribonucleósidos-trifosfatos.
- ✓ **FC**: Fijación del Complemento.
- ✓ **FAT**: Prueba de Inmunofluorescencia.
- ✓ **nad5**: NADH dehidrogenasa subunidad 5.
- ✓ **nd8**: NADH dehidrogenasa subunidad 8.
- ✓ **PCR**: Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- ✓ **RAPD**: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.
- ✓ **Taq polimerasa**: enzima que procede de la bacteria *Thermus aquaticus*.
- ✓ **T. brucei**: *Trypanosoma brucei*.
- ✓ **T. evansi**: *Trypanosoma evansi*.
- ✓ **T. equiperdum**: *Trypanosoma equiperdum*.
- ✓ **T. vivax**: *Trypanosoma vivax*.
- ✓ **18SrRNA**: subunidad 18S del ARN ribosomal.
- ✓ **12SrRNA**: subunidad 12S del ARN ribosomal

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 *Trypanosoma* spp.

Los tripanosomas son protozoarios unicelulares que causan importantes enfermedades en humanos y animales. Pertenecen taxonómicamente al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae y género *Trypanosoma*, principalmente son transmitidos por insectos succionadores de sangre (Desquesnes y col., 2013).

El género *Trypanosoma* se divide en dos secciones, con base en el modo de transmisión: Stercoraria y Salivaria. La primera incluye a los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, los cuales van progresando hacia la porción intestinal con la subsiguiente liberación de sus formas infectivas junto con las heces, como es el caso de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas en humanos. Por su parte, el segundo grupo incluye los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector y posteriormente atraviesan el epitelio digestivo llegando finalmente a las glándulas salivares. A este grupo pertenecen las tres sub-especies de *Trypanosoma brucei* (agentes etiológicos de Nagana en animales y de la enfermedad del sueño en humanos), *T. evansi* (agente causal de Surra o Derrengadera), *T. equiperdum* (agente causal de Durina) y *T. vivax* (agente causal de Nagana/Secadera) (Desquesnes y col., 2013; Gonzatti y col., 2014).

1.2 Trypanosoma equiperdum.

T. equiperdum pertenece al subgénero *Trypanozoon*, el cual incluye también a tres sub-especies de *T. brucei* (*T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense*) y al *T. evansi*. Es un parásito monomórfico, morfológicamente indistinguible y con dimensiones similares a *T. evansi* (14,0- 33 µm de longitud y 1,5- 2,2 µm de ancho), de forma alargada y delgada (Brun y col., 1998; Giardina y col., 2003; Sánchez y col., 2015; Suganuma y col., 2016).

1.2.1 Hospedadores.

Se ha reportado que *T. equiperdum* infecta caballos, burros y mulas. No se conoce otros hospedadores que équidos (Brun y col., 1998; Gizaw y col., 2017; Hébert y col., 2017).

Debido a que *T. equiperdum* es un parásito que se encuentra en tejidos de équidos infectados, su establecimiento y propagación en la sangre de animales de laboratorio resulta difícil. Sin embargo, cuando una cepa es adaptada a roedores de laboratorio, los parásitos pueden ser mantenidos de la misma manera que *T. evansi*, es decir, mediante infecciones en ratas o ratones con sangre infectada (Brun y col., 1998; OIE, 2013).

1.3 Durina: mecanismo de transmisión.

La Durina es una enfermedad contagiosa aguda o crónica de los équidos reproductores causada por *T. equiperdum*. Es la única tripanosomosis que no se transmite mediante un vector invertebrado, sino vía coito. No obstante, se ha reportado la transmisión de *T. equiperdum* a las crías durante el nacimiento y a

través de la lactancia materna (Giardina y col., 2003; Claes y col., 2005; OIE, 2013; Pascucci y col., 2013; Suganuma y col., 2016). Ocasionalmente se ha detectado la transmisión mecánica, por insectos succinadores de sangre, en animales con infección crónica (Brun y col., 1998; OIE, 2013; Gizaw y col., 2017).

Los animales afectados no siempre transmiten la infección en cada copulación, debido a que el tripanosoma no se encuentra presente de manera continua en el tracto genital a lo largo de todo el curso de la enfermedad, la transmisión de la infección puede ocurrir a través de diversas mucosas, como la conjuntiva y las glándulas mamarias (OIE, 2013).

1.3.1 Síntomas clínicos de durina.

A pesar de que el *T. equiperdum* posee una amplia distribución geográfica, el diagnóstico clínico de Durina puede ser complejo. Por lo cual se necesita un diagnóstico que confirme los signos clínicos que sugieren la presencia de la enfermedad (Giardina y col., 2003; Claes y col., 2005).

El periodo de incubación, gravedad y duración de la enfermedad varían considerablemente; a menudo es fatal, aunque se ha reportado que pueden producirse recuperaciones espontáneas y que existen portadores asintomáticos. Los burros y los mulos son más resistentes que los caballos y pueden permanecer como portadores subclínicos (OIE, 2013).

Esta enfermedad es caracterizada por presentar fases de empeoramiento, tolerancia o recaída, las cuales varían en cuanto a duración y que pueden aparecer una o varias veces antes de la muerte o la recuperación.

Esta enfermedad se divide en tres fases, cada una con signos característicos.

En la primera fase, la enfermedad es caracterizada por la aparición de edema, tumefacción y daño en la zona genital (Figura 1a y 1b), entre 1-2 semanas después de la infección. Por lo general, el edema desaparece y reaparece a intervalos regulares. La mucosa vaginal puede presentar placas semitransparentes elevadas y engrosadas, también puede producirse la despigmentación de la zona genital, el periné y la ubre. En el semental, el primer signo clínico consiste en una tumefacción variable del pene y el prepucio (Figura 1b). En la segunda etapa de la enfermedad, aparecen un síntoma que caracteriza y define la enfermedad: las placas cutáneas típicas, normalmente aparece en las costillas. No obstante, puede presentarse en cualquier parte del cuerpo, y generalmente, persiste de 3 a 7 días. La fiebre es intermitente. Por último, en la tercera fase, la Durina se caracteriza por la aparición de anemia progresiva, desorden del sistema nervioso, el cual incluye síntomas como falta de coordinación, principalmente de los miembros pélvicos, la boca, las fosas nasales, las orejas y la garganta. Normalmente, la parálisis facial es unilateral. En los casos fatales, la evolución de la enfermedad por lo general es lenta y progresiva, con un incremento de la anemia y pérdida de peso (Figura 1c) (Giardina y col., 2003; Claes y col., 2005, OIE, 2013).

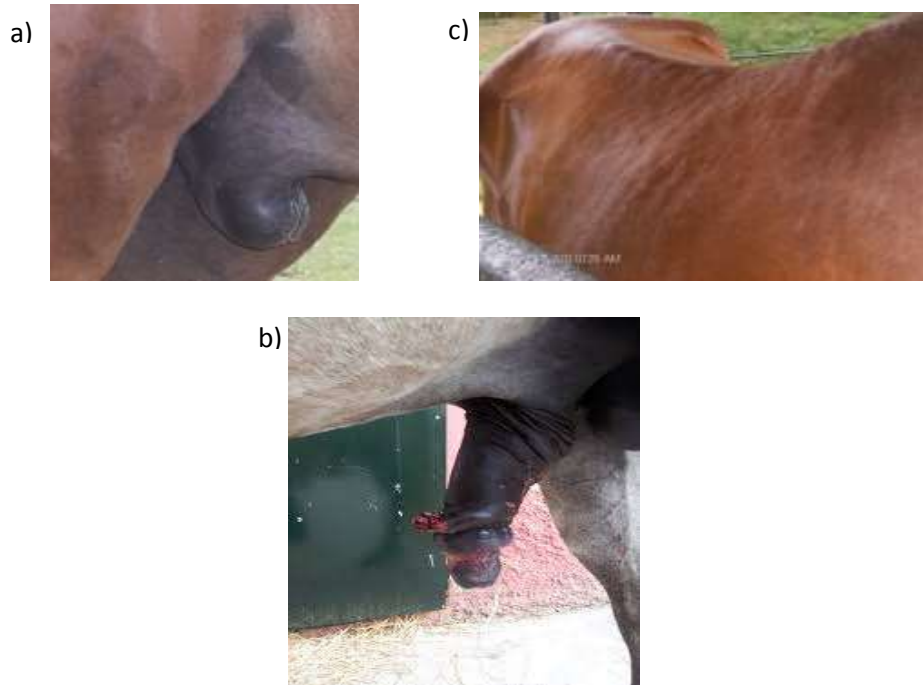


Figura 1: Síntomas clínicos de la Durina. (Fotos tomadas por el Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos de la Universidad Simón Bolívar).

1.4 ADN del kinetoplasto de *T. equiperdum*.

El kinetoplasto consiste en una porción de la mitocondria de los tripanosomas que contiene ADNk, el cual se encuentra ubicado en la región posterior del parásito (Figura 2). En el *T. equiperdum* está compuesto por una red compleja de ADN circular, conformada por minicírculos y maxicírculos.

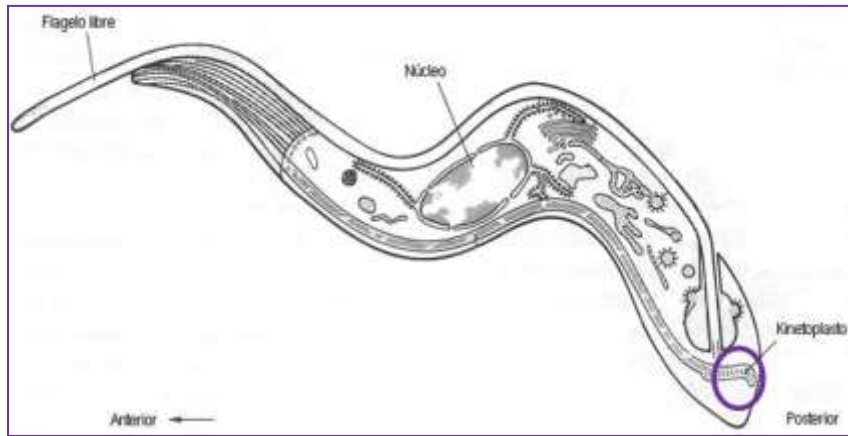


Figura 2: Morfología típica de un tripomastigote (Tomado y modificado de: <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/IllradRe1989v7n1/Endocytosis.htm>. Consultado en noviembre de 2017).

Los primeros se transcriben en moléculas pequeñas de ARN que participan en el proceso de edición de los transcritos de maxicírculos con la finalidad de producir marcos de lecturas funcionales. Mientras que los maxicírculos poseen una función genética, codifican para genes mitocondriales que son requeridos por el parásito durante los estadios de su ciclo de vida en el vector (Wei y col., 2011; Carnes y col., 2015). Así que, a nivel molecular, *T. evansi* y *T. equiperdum* pueden ser diferenciados ya que *T. evansi* presenta una ausencia completa de los maxicírculos, mientras que *T. equiperdum* ha retenido fragmentos de maxicírculos similares a los presentes en *T. brucei* (Figura 3) (Borst y col., 1987; Lai y col., 2008). Esta característica se ha relacionado directamente con el ciclo de vida de estos parásitos, ya que la ausencia de desarrollo biológico en el vector hace innecesaria la expresión de los genes mitocondriales, conllevando a la homogenización de los minicírculos y posterior delección de parte o todo el maxicírculo (Schnauffer y col., 2002; Lai y col., 2008).

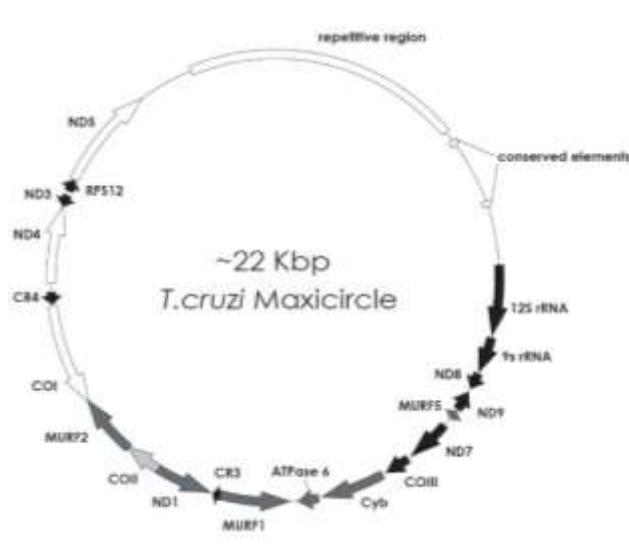


Figura 3: Esquema del maxicírculo de tripanosomatídeos que señala la ubicación de los genes mitocondriales que lo constituyen (Tomado y modificado de Westenberger y col., 2006).

1.5 Relación filogenética entre las especies pertenecientes a la sección Salivaria.

La relación de las cepas de *T. evansi* entre sí y con las cepas clasificadas como *T. equiperdum* y *T. brucei* es controversial. Se ha sugerido que *T. evansi* evolucionó a partir de una infección por *T. brucei* en camellos que se desplazaron al norte del cinturón de la mosca tse-tsé en África. Esta variedad posteriormente se adaptó a la transmisión mecánica a través de la picadura de moscas y se diseminó hacia áreas fuera del África sub-sahariana. Además, se especula que *T. equiperdum* pudo haber evolucionado a partir de una cepa equina de *T. evansi* al desarrollar tropismo a los tejidos genitales. Los análisis moleculares posteriores han demostrado que la mayoría de las cepas de *T. equiperdum*, a diferencia de *T. evansi*, poseen al menos un maxicírculo parcial, lo cual es inconsistente con un escenario en el que este haya evolucionado a partir de *T. evansi*. También se ha

propuesto un escenario en el que *T. evansi* surgió de un clon de *T. equiperdum* que perdió su maxicírculo (Figura 4) (Brun y col., 1998; Carnes y col., 2015).

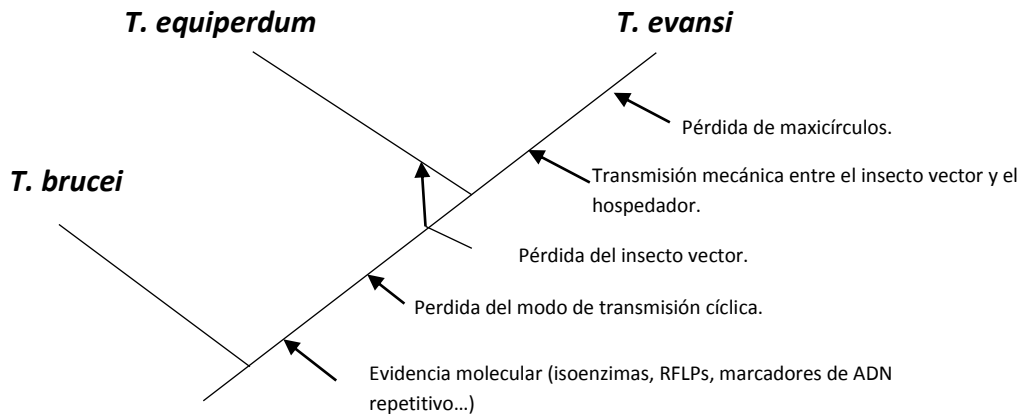


Figura 4: Relación filogenética entre tres especies de tripanosomas estrechamente relacionadas: *T. brucei*, *T. evansi* y *T. equiperdum* (tomado y modificado de Brun y col., 1998).

Estudios filogenéticos más recientes sugieren que el grupo de *T. evansi* y *T. equiperdum* no es monofilético y que algunos aislados de *T. equiperdum* han sido clasificados erróneamente como cepas de *T. evansi*, mientras que otros son una subespecie de *T. brucei* (Carnes y col., 2015). Estos análisis han demostrado que *T. evansi* y *T. equiperdum* evolucionaron más de una vez a partir de *T. brucei* y podrían clasificarse como subespecies de *T. brucei* (Figura 5) (Lun y col., 2010; Carnes y col., 2015).

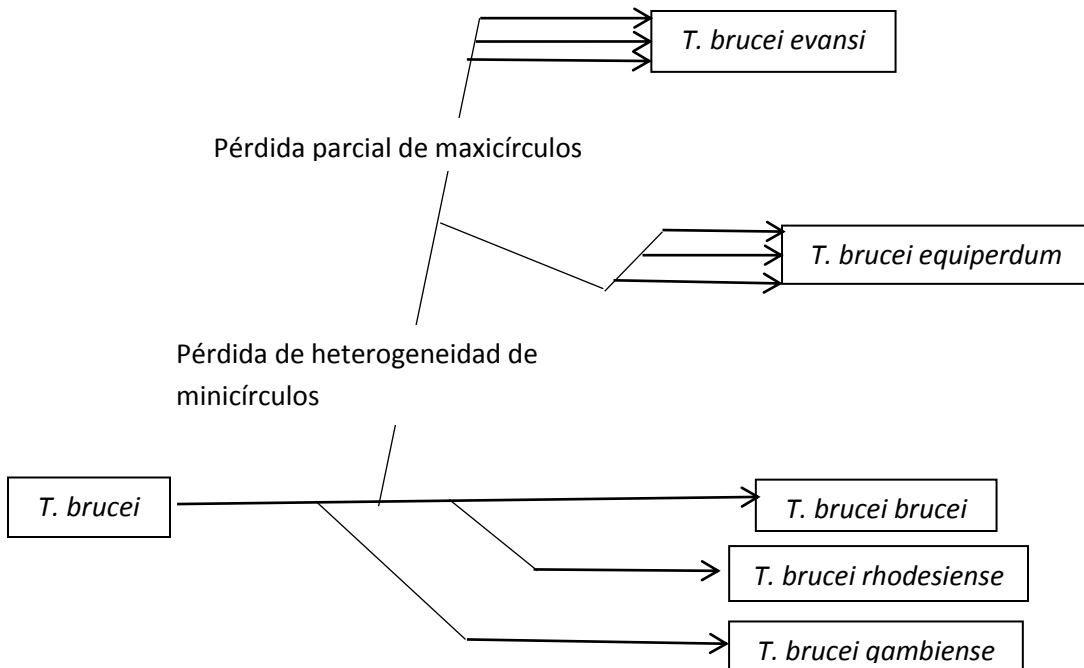


Figura 5: Árbol evolutivo hipotético del subgénero *Trypanozoon* (Tomado y modificado de Desquesnes y col., 2013).

Sin embargo, Desquesnes y colaboradores justifican mantener la clasificación taxonómica (género y especie) y el estatus de especies diferentes para *T. evansi* y para *T. equiperdum*, hasta tanto se logre consenso sobre una nomenclatura trinomial (género, especie y sub-especie) (Desquesnes y col., 2013).

1.6 Diagnóstico de Durina.

El diagnóstico de la Durina es un reto, debido al limitado conocimiento acerca del parásito y de su interacción con el hospedador a lo largo de la infección.

En la práctica, el diagnóstico está basado en la evidencia clínica respaldada por la serología (Gizaw y col., 2017). Los signos clínicos y las lesiones no siempre

se manifiestan, por lo que a pesar de que esta infección suele producir la muerte de équidos, la enfermedad puede estar presente en burros y mulas sin que se presenten signos clínicos obvios. Además, estos signos pueden confundirse con otras enfermedades, tales como la surra o derrengadera, causada por *T. evansi*. El diagnóstico de laboratorio también es difícil debido al bajo número de parásitos normalmente presente en tejidos infectados (Brun y col., 1998; Claes y col., 2005; OIE, 2013; Pascucci y col., 2013; Suganuma y col., 2016). Por lo tanto, se recomienda que el diagnóstico de Durina sea confirmado utilizando ensayos parasitológicos, serológicos y moleculares (Gari y col., 2010).

Los métodos de identificación basados en el ADN exploran la identidad genética intrínseca del organismo, proporcionando una huella genética, cualquiera sea el estadio del ciclo de vida en el que se encuentre este organismo, por lo cual constituye una herramienta de interés en la parasitología. Estos métodos proporcionan excelentes resultados, aun cuando la morfología haya sido pobremente preservada, o en condiciones de bajas parasitemia en la muestra o cuando el ADN del parásito se encuentra contaminado con el ADN del hospedador.

Como *T. equiperdum* es el único tripanosoma que afecta a los caballos en zonas libres de Nagana y Surra, la observación de los tripanosomas en extensiones de sangre de gota gruesa es suficiente para realizar un diagnóstico positivo. En países donde existen Nagana o Surra, es difícil diferenciar al microscopio a *T. equiperdum* de otros miembros del subgénero *Trypanozoon* (OIE, 2013).

Un caso confirmado de durina se define como un animal que ha dado un resultado positivo mediante FC, FAT o PCR y que presenta signos clínicos compatibles con la durina, presenta un aumento del título serológico en la prueba de la FC en dos pruebas consecutivas o está epidemiológicamente vinculado a un caso confirmado de durina (OIE, 2013).

2. ANTECEDENTES.

La Durina fue reconocida por primera vez en Europa por Ammon y Dirkhausen en 1796, en un semental Prusiano. Sin embargo, su agente etiológico fue reconocido en 1896, cuando Rouget descubrió *Trypanosoma* en un caballo argelino infectado (Claes y col., 2005; OIE, 2013).

Buffard y Schneider fueron capaces de reproducir por primera vez la Durina en un caballo mediante la inoculación de un aislado obtenido de un caballo argelino infectado naturalmente. Estos resultados permitieron identificar inequívocamente al *T. equiperdum* como el agente causal de la Durina. Sin embargo, se presentaron dificultades para detectar el parásito en algunos casos de Durina en Argelia. Por lo tanto, Chauvrat y Busy, pusieron en duda que *T. equiperdum* fuese el agente causal. Por otro lado, Buffard y Schneider sugirieron en 1902 que ese parásito era el agente etiológico de la Surra o Nagana (Claes y col., 2005).

Durante varios años, se puso en duda la existencia de *T. equiperdum* como una especie separada. Para aquellas cepas de *T. equiperdum* aisladas hace más de 50 años, previo al advenimiento de las técnicas de Biología Molecular, se ha puesto en duda su clasificación y su relación con el agente causal de la Durina (Claes y col., 2005). Actualmente, se cuestiona el estatus de *T. equiperdum* como especie o sub-especie de *T. brucei* (*Trypanosoma brucei equiperdum*) (Carnes y col., 2015; Sukanuma y col., 2016).

Desde el siglo XIX, la Durina se presentó esporádicamente en Europa. Alrededor de 1918, la enfermedad fue reportada solamente en Rusia, Turquía, Hungría y España. Durante la Segunda Guerra Mundial, *T. equiperdum* fue introducido en Europa Occidental por los caballos rusos y argelinos usados por el ejército alemán y francés, respectivamente. Después de la guerra, la enfermedad fue erradicada de Europa Occidental (Claes y col., 2005). La OIE ha reportado caballos sospechosos de estar infectados con Durina en Etiopía, Botswana, Alemania, Pakistán, Rusia, Sur América y Mongolia (Claes y col., 2005; Suganuma y col., 2016).

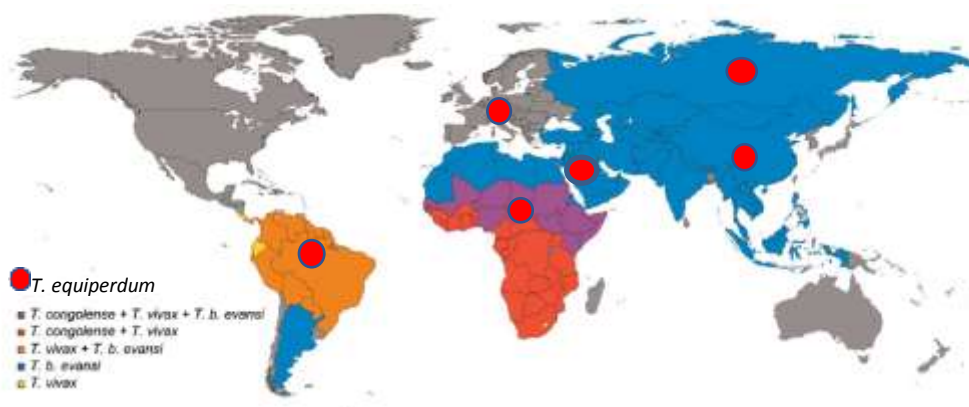


Figura 6: Países en donde están presentes los principales tripanosomas que afectan a animales (Tomado y modificado de Giordani y col., 2016).

La infección es endémica en muchas áreas de Asia y África. También es hallada en el Oriente Medio, Rusia, Suramérica y en Europa Oriental (Gillingwater y col., 2007; Li y col., 2007; Pascucci y col., 2013; Sánchez y col., 2015; Giordani y col., 2016; Suganuma y col., 2016).

En Etiopía por primera vez fueron analizados 237 equinos originarios de dos distritos sospechosos de albergar a *T. equiperdum*. Se comprobó la existencia de tripanosomas causantes de Durina en el 11/237 de los animales estudiados usando la prueba de Woo. La alta prevalencia de Durina fue demostrada mediante pruebas serológicas y estudios moleculares. Fue realizada la prueba de CATT/*T. evansi* y ensayos de PCR usando como marcadores moleculares a *RoTaT 1.2* y la región *18S*, reportando una prevalencia de la enfermedad en 64/237, 87/237 y 113/237 animales, respectivamente. Revelando que Durina es altamente predominante y una de las principales enfermedades que afectan a los caballos en esa área (Gari y col., 2010).

En el año 2011 se notificó un brote de Durina en Italia, los síntomas clínicos de esta enfermedad fueron observados en varios caballos, a pesar de que esta enfermedad había sido erradicada de Italia en 1940. Se confirmó que 13 de los 118 caballos eran Durina positivos, luego de realizar análisis clínicos, moleculares y serológicos (Pascucci y col., 2013; Suganuma y col., 2016).

Reportes previos han mostrado la prevalencia de tripanosomosis en équidos en Mongolia es del 6-8% (Suganuma y col., 2016). Sin embargo, esta cepa de *T. equiperdum* no fue aislada directamente de la mucosa genital y las técnicas de diagnóstico serológico usadas no permitieron diferenciar entre *T. equiperdum* y *T. evansi*. Además, la técnica de PCR aplicada tampoco permitió realizar esta diferenciación debido a que se usó una PCR género-específico, usando cebadores TBR1/2, específicos para *T. brucei* (Clausen y col., 2003). No obstante, se demostró la alta prevalencia de tripanosomosis en caballos.

Los genes mitocondriales han sido propuestos como excelentes marcadores moleculares para diferenciar especies estrechamente relacionadas (Sánchez y col., 2015). La mayor diferencia, a nivel molecular, entre las especies pertenecientes al subgénero *Trypanozoon* es la ausencia de ADNk en *T. evansi* y una deleción parcial del ADNk en algunas cepas de *T. equiperdum*. Se ha utilizado una prueba de PCR basada en la secuencia de ADNk de *T. brucei* a fin de distinguir *T. brucei* y *T. equiperdum* de *T. evansi* (Li y col., 2007).

En el año 2007, Li y colaboradores desarrollaron una PCR usando los cebadores que codifican para la secuencia de maxicírculo de la NADH dehidrogenasa subunidad 5 de *T. brucei* (Li y col., 2007).

La Durina fue diagnosticada parasitológicamente en Mongolia, a través de la detección de *T. equiperdum* en el tracto uretral de un semental que poseía los síntomas clínicos característicos de la enfermedad. Fue realizado un diagnóstico molecular que permitió identificar una nueva cepa de *T. equiperdum* (IVM-t1) amplificandoe el gen de la NADH dehidrogenasa subunidad 4 y 5 del maxicírculo (Suganuma y col., 2016).

También han sido amplificadas otras secuencias de maxicírculos basadas en la secuencia completa de los siguientes genes de *T. brucei*: *cytb*, *cox1*, *A6* y *nd8* (Sánchez y col., 2015).

Perrone y colaboradores analizaron a nivel genético nueve aislados de *Trypanosoma* obtenidos de infecciones naturales en tres hospederos distintos (chigüires, caballos y burros) provenientes de los estados Apure y Guárico en

Venezuela. Inicialmente se presumía que estos aislados fueran *T. evansi*. Fueron realizados análisis de RAPD, obteniéndose como resultado que siete de los nueve aislados mostraron alto grado de homogeneidad, mientras que dos de los tres aislados de caballos (TeAp-N/D1 y TeGu-N/D1) mostraron distintos patrones de amplificación de RAPD, sugiriendo heterogeneidad genética. Este estudio es la primera evidencia de polimorfismo de Trypanosomas aislados en Venezuela (Perrone y col., 2009).

En el año 2015, Sánchez y colaboradores analizaron los nueve *Trypanosoma* aislados de Venezuela mediante microsatélites, obteniendo como resultado la retención de al menos cuatro genes de maxicírculo en dos de los aislados (TeAp-N/D1 y TeGu-N/D1), por lo que estos fueron clasificados como *T. equiperdum* y relacionados con la cepa africana OVI, siendo éste el primer reporte molecular de *T. equiperdum* en América Latina (Sánchez y col., 2015).

En año 2017 fue publicado el primer genoma de una cepa clasificada como *T. equiperdum* (*T. equiperdum* OVI), lo que permitirá realizar estudios genómicos comparativos entre los miembros del subgénero *Trypanozoon*, sus hospederos y enfermedades (Hébert y col., 2017).

En el 2018 fue desarrollado un ensayo de ELISA indirecto para la detección de Durina en animales infectados. Fueron confirmados casos serológicos positivos para Durina y resolvieron resultados inconclusos en sueros provenientes de 20 casos clínicos procedentes del brote de Durina ocurrido en Italia en el 2011, usando la cepa OVI de *T. equiperdum* como antígeno. Sin embargo, sugieren que

el ensayo desarrollado sea considerado como una validación adicional y alternativa, siempre que otros métodos serológicos recomendados no sean concluyentes o dudosos, pero no para el diagnóstico diferencial, debido al uso de un antígeno crudo que puede arrojar como resultados falsos positivos, debido a la reactividad cruzada causada por las similitudes antigénicas entre los diferentes tripanosomas del pertenecientes al subgénero Trypanozoon (Bonfini y col., 2018).

Actualmente, fue publicado el genoma completo de la cepa de *T. equiperdum* IVM-t1, la cual fue aislada del tracto urogenital del caballo diagnosticado con Durina en Mongolia en el 2016, proporcionando así recursos para estudios genéticos posteriores de tripanosomas y permitirá identificar algunos genes específicos de *T. equiperdum* (Davaasuren y col., 2019).

Es importante destacar que uno de los reactivos necesarios para poder llevar a cabo la realización de ensayos de diagnóstico molecular es la enzima *Taq* polimerasa, denominada así por proceder de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta bacteria se encuentra ubicada en manantiales calientes, razón por la cual la enzima *Taq* polimerasa es capaz de mantener su estabilidad a temperaturas de hasta 95 °C, haciéndola ideal para poder ser empleada en la mezcla de reacción de PCR. Sin embargo, la no disponibilidad de divisas para la adquisición de insumos y reactivos de laboratorio en Venezuela, en particular la enzima *Taq* Polimerasa importada, representa una gran limitante para la realización de ensayos de diagnóstico molecular. Por lo tanto, este trabajo fue realizado usando una enzima *Taq* Polimerasa nacional recombinante, expresada en *E. coli* para estandarizar ensayos de PCR para el diagnóstico de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), donada

por el Laboratorio del Dr. Jacobus De Waard, del Instituto de Biomedicina (Caracas, Venezuela), la cual ha sido usada en el diagnóstico de tuberculosis en dicho laboratorio.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Estandarizar ensayos de diagnóstico molecular de *T. equiperdum* con una enzima *Taq* Polimerasa de producción nacional.

3.2 Objetivos específicos.

- ✓ Expandir y purificar parásitos criopreservados de *T. equiperdum*.
- ✓ Extraer el ADN de los parásitos purificados.
- ✓ Diseñar cebadores mitocondriales para la realización de ensayos especie-específicos.
- ✓ Realizar ensayos de la sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular con muestras de ADN de equino infectado experimentalmente.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 Infección de ratas con *T. equiperdum*.

Para la infección con *T. equiperdum* se utilizaron ratas albinas (Sprague-Dawley) entre 250 a 300g de peso, aproximadamente. Las ratas fueron infectadas mediante una inyección por vía intraperitoneal de 50 μ L de una muestra criopreservada de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), con un contenido de alrededor de 100 parásitos por campo. Se estimó la parasitemia a partir del análisis por microscopio óptico de una muestra de sangre extraída de la cola de las ratas cada dos días. Cuando el número de parásitos alcanzó valores superiores a 100 por campo, se extrajo la sangre infectada de las ratas, anestesiadas previamente en una cámara de cloroformo, por punción cardíaca utilizando una solución 0,5 M de EDTA como anticoagulante.

4.2 Activación de la resina DEAE-celulosa.

Se resuspendió la resina seca en cinco volúmenes de agua destilada y se dejó sedimentar a temperatura ambiente (TA) por 30-45 minutos. Luego, se midió el volumen de la resina a ser usado posteriormente y se eliminó el sobrenadante por succión. Se añadieron dos volúmenes de solución de lavado (0,1M NaOH con 0,5M NaCl) por 10 minutos a TA. Posteriormente, se decantó el sobrenadante por succión, removiendo la resina e incorporando un volumen de solución de lavado por 5 minutos. Se repitió el lavado con dos volúmenes de solución.

A continuación, se añadieron dos volúmenes de solución 0,5 M de NaCl por 10 minutos a TA. Se decantará el sobrenadante por succión, removiendo la resina

e incorporando un volumen más de solución por 5 minutos. Se repitió el lavado con dos volúmenes de solución.

Se dejó sedimentar la resina y se resuspendió sucesivamente con una solución 0,1 M de HCl conteniendo 0,5 M de NaCl.

Inmediatamente se añadieron dos volúmenes de agua destilada por 10 minutos a TA. Se decantó el sobrenadante por succión, removiendo la resina e incorporando un volumen de agua destilada por 5 minutos. Se repitió el lavado con dos volúmenes de agua destilada. Se continuó con los lavados con 5-10 volúmenes de agua destilada hasta alcanzar un pH de 5 o menor.

Por último, la resina será resuspendió en dos volúmenes de solución 1 M de NaCl ajustando el pH a 7-8 con NaOH.

Una vez activada la resina, esta fue empaquetada en una columna con la finalidad de alcanzar rápidamente la condición de equilibrio. Se utilizó una solución amortiguadora 0,005 M de NaH_2PO_4 para lavar y alcanzar pH 8.

4.2.1 Empaquetamiento de la resina.

Se colocó un tampón de fibra de vidrio en una inyectora de 60 cc, a la cual se le conectó una manguera y una pinza para controlar el flujo. Con la pinza cerrada se añadió la resina lentamente. Se abrió la pinza y se dejó sedimentar la resina, cuidando de añadir solución de equilibrio para evitar que se secase la resina. Se lavó y equilibró la resina con solución tampón de fosfato salino con glucosa (PBSG) en una proporción 6:4 con agua destilada (6 volúmenes de solución fosfato de sodio + 4 volúmenes de agua destilada + 1% p/v glucosa),

preparada a partir de una solución amortiguadora de fosfato salino (5 mM NaH_2PO_4 , 95 mM Na_2HPO_4 , 73 mM NaCl , pH 8), se aseguró siempre de que el pH del eluído fuera de 8.

4.3 Purificación de *T. equiperdum*.

Para purificar los parásitos se siguió el protocolo de Lanham y Godfrey (1970). La sangre recolectada de las ratas se sometió a centrifugación a 3000xg a 4 °C durante 20 minutos, se descartó el plasma sanguíneo y se recolectó la capa intermedia de células, la cual fue resuspendida en solución amortiguadora PBSG en una relación 1:3. Finalmente, se vertieron de 6-7 mL de suspensión de parásitos por cada 5 mL de resina. Se recolectaron los parásitos a 4°C y se contó el número de parásitos, mediante una cámara de Neubauer.

Luego, los parásitos fueron recuperados por centrifugación a 750xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se lavó el sedimento con un volumen adecuado de solución PBSG. Finalmente, los parásitos fueron resuspendidos en un volumen adecuado de solución PBSG y guardados a 4°C para su posterior uso.

4.4 Aislamiento de ADN genómico a partir de parásitos purificados y la evaluación cuantitativa y cualitativa del mismo y de los controles a utilizar.

El ADN genómico fue extraído siguiendo el protocolo modificado descrito por Bowen y Keeney (2003). Los parásitos fueron resuspendidos en 700 μL de solución amortiguadora de fosfato salino (95 mM Na_2HPO_4 anhidro, 5 mM NaH_2PO_4 , 73 mM NaCl).

Se agregaron 700 μ l de buffer de lisis celular (10 mM Tris-HCl pH 8, 11% p/v sacarosa, 5 mM $MgCl_2$, 1% v/v Tritón X-100), luego se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente (TA), la muestra fue centrifugada a 750xg por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante. Al precipitado formado se le agregó 300 μ l de solución tampón de lisis nuclear (10 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 10 mM citrato de sodio, 1% p/v SDS), 500 μ l de Cloroformo frío y 100 μ l de NaCl 5,3 M. La mezcla se agitó por inversión hasta que se formó una emulsión, la cual fue centrifugada a 750xg por 5 minutos a TA con la finalidad de separar la fase acuosa de la orgánica. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, al cual se le añadió 600 μ L de etanol absoluto frío y se mezcló por inversión hasta la aparición de la malla de ADN. Posteriormente, se centrifugó a 750xg por 10 minutos y se descartó el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol. Finalmente, se rehidrató el ADN con 50 μ l de agua destilada estéril, libre de nucleasas, y se incubó a 60°C por una hora.

La concentración y pureza del ADN aislado se determinó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación 260/280 nm, respectivamente, en un espectrofluoroluminómetro GENios TECAN. El cálculo fue realizado utilizando el siguiente factor de conversión: una unidad de absorbancia a 260nm equivale a una concentración final de 50 μ g/mL de ADN doble cadena.

La evaluación cualitativa del ADN genómico total extraído se realizó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0,8% p/v. Los geles fueron preteñidos con SYBR® Safe gel stain (Molecular Probes® by Invitrogen) al 0,01%. Las corridas tuvieron una duración de aproximadamente 10 min a un voltaje de

100V en buffer TAE 0,5X (Tris-acetato a 40 mM, EDTA a 1 mM), usando una cámara horizontal de electroforesis Wide Mini Sub™ (BIO-RAD). Finalmente, la visualización de las bandas se realizó mediante la exposición a luz UV a través de un transiluminador (High Performance Ultraviolet Transilluminator).

También fue realizada la evaluación cualitativa y cuantitativa de unas muestras de ADN de *T. evansi* y *T. vivax* presentes en el laboratorio para ser usadas como controles durante la realización de los ensayos de PCR con los cebadores mitocondriales.

4.5 Diseño de cebadores para marcadores mitocondriales.

Los cebadores fueron diseñados mediante una alineación múltiple de secuencias que se encontraban reportadas en la base de datos GenBank® disponible en el sitio web NCBI (de las siglas en inglés National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A continuación, los códigos de acceso de secuencia para el diseño de los cebadores, así como también las secuencias de estos en la tabla 1:

Tabla 1. Juego de cebadores utilizados para la amplificación por PCR especie específica.

Gen	Cebadores 5'-3'	GenBank accession number
<i>nad5</i>	F-TCAAATGGTTTTTGTATGACAACCTT R-TGGGATAGGTCCTTCCATAGC	M14820
<i>cytb</i>	F-TTCCAGATAAGTTTATGGGTTTG R-TTCCATTCATATTGGGTATGCT	KP729379
<i>cox1</i>	F-AGAGGGTATGGGGGTTGGT R-TGTCAACAAGGCACCTCAA	KP729381
<i>12SrRNA</i>	F-GGGCAAGTCCTACTCTCCTTT R-CAACGATTTTAACCCAACCTAACG	EU185800.1

La alineación fue realizada con ayuda del programa BioEdit en formato FASTA. Una vez obtenida la secuencia consenso se procedió al diseño de cebadores con el programa Primer 3 Input (versión 0.4.0), el cual calcula parámetros como longitud del producto de PCR esperado y temperatura de hibridación de los cebadores, como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Tamaño estimado de los productos esperados en la PCR y temperatura de hibridación teórica reportada para cada par de cebadores.

Gen	Tamaño	Temperatura de hibridación de los cebadores (°C)	
		Sentido	Antisentido
<i>nad5</i>	165pb	57,6	61,3
<i>cytb</i>	203pb	57,5	56,6
<i>cox1</i>	219pb	59,5	56,4
<i>12SrRNA</i>	228pb	61,3	59,3

Una vez que se obtuvo la secuencia de estos cebadores fueron sintetizados.

4.6 Estandarización de la PCR con los cebadores especie específicos.

Estos ensayos fueron realizados utilizando una *Taq* Polimerasa recombinante de producción nacional donada por el Laboratorio del Dr. Jacobus De Waard, del Instituto de Biomedicina (Caracas, Venezuela).

La estandarización de la PCR con los cebadores especie específicos se realizó utilizando una mezcla de reacción con un volumen final de 12,5 μ l.

En la Tabla 3 se observan las concentraciones iniciales y finales para cada reacción usando los cebadores mitocondriales *cytb*, *cox1*, y *12SrRNA*.

Tabla 3. Reactivos y concentraciones empleados para cada reacción usando los cebadores *cytb*, *cox1*, y *12SrRNA*.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer <i>Taq</i>	5X	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM
Cebador sentido	10 μ M	0,8 μ M
Cebador antisentido	10 μ M	0,8 μ M
<i>Taq</i> polimerasa nacional	5 U/ μ L	0,25 U/ μ L
ADN molde		100ng

Las condiciones de amplificación usando los cebadores *cytb* y *cox1* fueron tomadas de Sánchez y colaboradores, las cuales consistieron en un primer ciclo

de desnaturalización a 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización 94°C por 45 segundos, hibridación a 52°C por 45 segundos, extensión a 72°C por 45 segundos, y un último ciclo de 5 minutos a 72°C para la extensión final (Sánchez y col., 2015).

En cuanto a las amplificaciones con los cebadores *12SrRNA*, como no se tenía punto de partida, ya que no se había realizado ningún diagnóstico con estos cebadores, fue utilizado el protocolo de amplificación reportado por Sánchez y colaboradores (Sánchez y col., 2015), descrito anteriormente, con la diferencia de que fue realizado un gradiente de temperatura, basado en la temperatura de fusión reportada por los cebadores.

En el caso de las amplificaciones usando los cebadores *nad5* fueron usados las concentraciones de reactivos reportadas en la siguiente tabla:

Tabla 4. Reactivos y concentraciones empleados para cada reacción usando los cebadores *nad5*.

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final
Buffer <i>Taq</i>	5X	1X
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	0,2 mM
Cebador sentido	10µM	0,2 µM
Cebador antisentido	10 µM	0,2 µM
<i>Taq</i> polimerasa nacional	5U/ µL	0,25 U/ µL
ADN molde		100ng

Fueron usadas como condiciones de amplificación las descritas en el protocolo de Li y colaboradores, las cuales consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, hibridación a 55 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos y una extensión final a 72°C por 10 minutos (Li y col., 2007).

Como control positivo, para la PCR, se utilizó ADN genómico total de *Trypanosoma equiperdum* (criopreservado TeAp-N/D1) proveniente de infecciones experimentales en ratas y como controles negativos se utilizaron agua estéril, libre de nucleasas, y ADN genómico total de un equino sano, con la finalidad de comprobar que el ADN del hospedador no fuese complementario con la secuencia de los cebadores.

Una vez que las reacciones de PCR se llevaron a cabo, fue realizada la verificación de los productos amplificados mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15% p/v teñidos con nitrato de plata al 0,15% p/v. La corrida tuvo una duración de 180 minutos a 100 voltios y fue realizada en una cámara de electroforesis vertical. La tinción se realizó según la metodología de Posso D., y Ghneim (2009).

4.7 Comparación de sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular.

Para comparar la sensibilidad del diagnóstico molecular de cada par de cebadores mitocondriales, se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000 del ADN de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1) purificado, en agua libre estéril, libre de nucleasas, partiendo de una concentración de 100 ng/μL

de ADN total de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1). Fueron probadas las siguientes cantidades de ADN en cada ensayo de sensibilidad: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng y 0,001 ng. Esto con la finalidad de determinar el límite de detección de ADN que posee cada par de cebadores mitocondriales.

Posteriormente, se procedió a la realización de ensayos de PCR con los cebadores especie-específicos, utilizando una *Taq* Polimerasa recombinante de producción nacional. Fueron realizados ensayos de PCR con muestras de ADN de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), así como cepas de *T. evansi* y *T. vivax*, cuyas concentraciones y purezas de los ADN fueron determinadas por espectrofotometría. Se usaron 100 ng/μL de ADN en cada reacción de PCR.

En la siguiente tabla se muestran las distintas cepas de tripanosomas usadas durante los ensayos de especificidad basados de PCR con los cebadores mitocondriales:

Tabla 5. Cepas empleadas durante los ensayos de especificidad de PCR usando los cebadores mitocondriales.

<i>Trypanosoma</i>	Cepa	Hospedador	Localidad
<i>T. equiperdum</i>	TeAp-N/D1	Caballo	No determinado, Estado Apure
<i>T. evansi</i>	TeAp-ElFrio01	Chigüire	Hato El Frio, estado Apure
	TeGu-02	Caballo	No determinado, Estado Guárico
	TeGu-Terecay323	Burro	Hato Terecay, estado Guárico
	TeAp-Cedral05	Chigüire	Hato El Cedral, estado Apure
	TeGu-Terecay03	Burro	Hato Terecay, estado Guárico
	TeAp-Mantecal01	Caballo	Mantecal, estado Apure
<i>T. vivax</i>	TvLi	Ovejo	Estado Trujillo

También, fue realizada la evaluación cualitativa de los ADN genómico total extraído por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0,8% p/v, los cuales fueron preteñidos con SYBR® Safe gel stain (Molecular Probes® by Invitrogen) al 0,01% p/v. Las corridas tuvieron una duración de aproximadamente 15 min a un voltaje de 100 voltios en buffer TAE 0,5X (Tris-acetato a 40mM, EDTA a 1mM), usando una cámara horizontal de electroforesis Wide Min Sub™ (BIO-RAD). Finalmente, la visualización de las bandas se realizó mediante la exposición a luz UV a través de un transiluminador (High Performance Ultraviolet Transilluminator).

Una vez que las reacciones de PCR se llevaron a cabo, se realizó una verificación de los productos amplificados mediante electroforesis en geles de acrilamida al 15% p/v teñidos con nitrato de plata al 0,15% p/v. La corrida tuvo una duración de 180 minutos a 100 voltios y fue realizada en una cámara de electroforesis vertical. La tinción se realizó según la metodología de Posso D., y Ghneim (2009).

Una vez obtenida la sensibilidad y especificidad de los cebadores mitocondriales diseñados fue realizado el diagnóstico molecular con muestras de ADN total obtenidas de un équido infectado experimentalmente, con *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), con el par de cebadores que mostró mayor sensibilidad para amplificar alguna región del maxicírculo.

La infección experimental del équido analizado en este trabajo fue realizada en el año 2013, por el personal del Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos de la Universidad Simón Bolívar. Al caballo estudiado le fue realizado un registro de parasitemia, temperatura y hematocritos durante toda la infección experimental, dichos datos fueron utilizados en este trabajo para establecer una relación con el diagnóstico molecular de muestras de ADN provenientes de la infección experimental.

5. RESULTADOS.

5.1 Infección de ratas con *T. equiperdum*, activación de la resina DEAE-celulosa y su empaquetamiento, purificación de parásitos y aislamiento de ADN genómico.

La infección de ratas con *T. equiperdum*, la activación de la resina DEAE-celulosa y su empaquetamiento, así como la purificación de los parásitos y el aislamiento del ADN genómico de éstos fueron realizados siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.1, 5.2, 5.3 y 5.4 de materiales y métodos, respectivamente.

Fue realizada una purificación obteniendo un total de $1,5 \times 10^{10}$ parásitos.

5.2 Comprobación del ADN genómico total extraído a partir de los parásitos purificados.

Los ADN genómicos extraídos fueron comprobados cualitativa y cuantitativamente siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.4 de materiales y métodos.

En la extracción se obtuvo una concentración de ADN de 196,98 ng/ μ L con una pureza de 2,8, lo que nos indica la posible presencia de ARN en la muestra (<http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

[Consultado: 02/03/19]).

Una vez extraídos el ADN a partir de los parásitos purificados y determinada su concentración, se procedió a realizar una evaluación cualitativa de estos, encontrándose que las muestras de ADN estaban en buen estado, según lo observado en la figura 7, en donde se detalla una banda definida y de alto peso molecular.

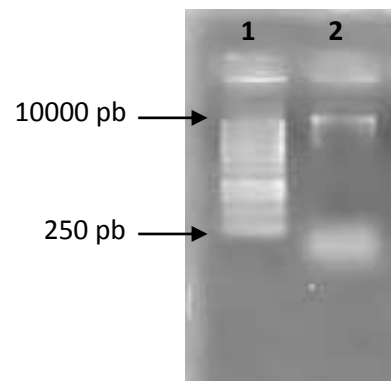


Figura 7: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar integridad del ADN genómico total extraído a partir de parásitos purificados. Gel de agarosa al 0,8% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: ADN *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1).

En cuanto a la evaluación cualitativa de las muestras usadas como controles durante los ensayos de PCR con los cebadores mitocondriales, podemos observar igualmente la presencia de bandas definidas y de alto peso molecular (Figura 8), lo que nos indica que estas se encontraban en buen estado.

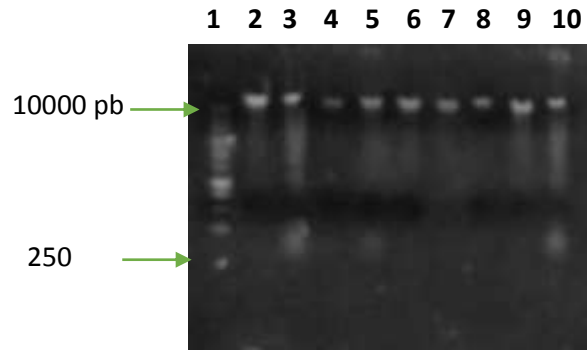


Figura 8: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad de los ADN genómicos usados como controles durante los ensayos de PCR con los cebadores mitocondriales. Gel de agarosa al 0,8% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: ADN *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1). Carril 3: TeAp-ElFrío01. Carril 4: TeGu-02. Carril 5: TeGu-Terecay323. Carril 6: TeAp-Cedral05. Carril 7: TeGu-Terecay03. Carril 8: TeAp-Mantecal01. Carril 9: TvLi. Carril 10: equino sano.

Por otro lado, en la evaluación cualitativa de las muestras de ADN genómicos provenientes de la infección experimental se observan bandas de bajo peso molecular (Figura 9), lo que nos indica que estas muestras se encontraban degradadas o contaminadas con ARN. Todas estas muestras presentaban una pureza mayor a 2,8, lo cual la presencia de ARN en las muestras a evaluar (<http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf> [Consultado: 02/03/19]).

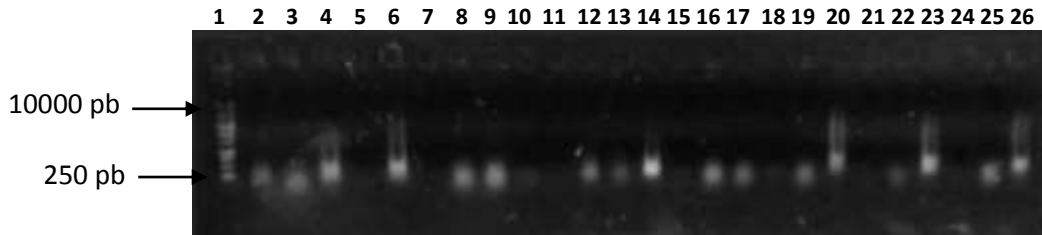


Figura 9: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar la integridad de los ADN genómicos provenientes de la infección experimental con TeAp-N/D1. Gel de agarosa al 0,8% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: preinfección. (Desde el carril 3 al 26: días postinfección) Carril 3: día 2. Carril 4: día 3. Carril 5: día 3*. Carril 6: día 4. Carril 7: día 4*. Carril 8: día 5. Carril 9: día 7. Carril 10: día 9. Carril 11: día 10*. Carril 12: día 11. Carril 13: día 12. Carril 14: día 13. Carril 15: día 13*. Carril 16: día 14. Carril 17: día 16. Carril 18: día 16*. Carril 19: día 19. Carril 20: día 21. Carril 21: día 21*. Carril 22: día 23. Carril 23: día 26. Carril 24: día 26*. Carril 25: día 33. Carril 26: día 36. (*= ADN re-extraído).

Es importante señalar que estas muestras fueron usadas, como ADN molde al momento de realizar el diagnóstico molecular con el par de cebadores mitocondriales que arrojara mayor sensibilidad.

5.3 Estandarización de la PCR con los cebadores especie específicos.

Los ensayos de estandarización de la PCR se realizaron con el objetivo de proporcionar los datos necesarios para lograr validar los marcadores mitocondriales.

En la figura 10, se observa el producto de PCR obtenido durante el ensayo con los cebadores mitocondriales *cytb*. Para ello fue utilizado como control positivo ADN molde de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), ADN de equino sano como control negativo, además de agua como control del sistema de reacción.

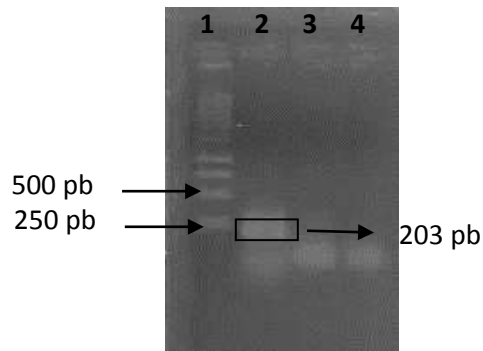


Figura 10: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores *cytb*. Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: producto de PCR. Carril 3: ADN de equino sano. Carril 4: agua.

En este caso, se partió del protocolo descrito por Sánchez y colaboradores (2015), logrando observar un amplicón de aproximadamente 203 pb, el cual corresponde al tamaño de producto de PCR esperado.

Igual que en el caso anterior, fue usado el protocolo descrito por Sánchez y colaboradores (2015) para la estandarización de la PCR con los cebadores mitocondriales *cox1*, utilizando ADN molde de TeAp-N/D1 como control positivo y como control negativo ADN de un equino sano. También fue usado agua como control de la PCR. Pudiéndose observar el resultado obtenido en la siguiente figura:

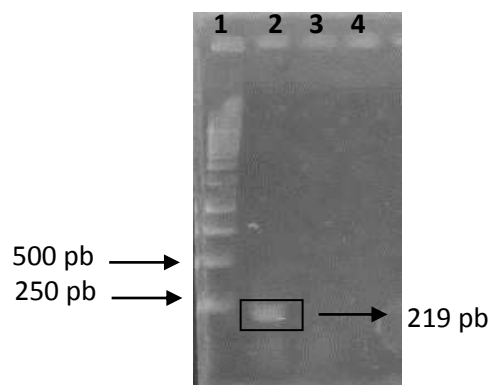


Figura 11: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores *cox1*. Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: producto de PCR. Carril 3: ADN de equino sano. Carril 4: agua.

Se logró obtener un amplicón de aproximadamente 219 pb en el carril correspondiente a la muestra de ADN de TeAp-N/D1, durante el ensayo con los cebadores mitocondriales *cox1* (Figura 11).

Por otra parte, durante la estandarización de los ensayos con los cebadores mitocondriales *nad5* se siguió el protocolo descrito por Li y colaboradores (2006). Fue usado ADN molde de TeAp-N/D1 como control positivo y como control negativo ADN de un equino sano. Además, agua como control de la PCR. Sin embargo, no se logró la amplificación del producto de PCR, según lo reflejado en la figura 12.

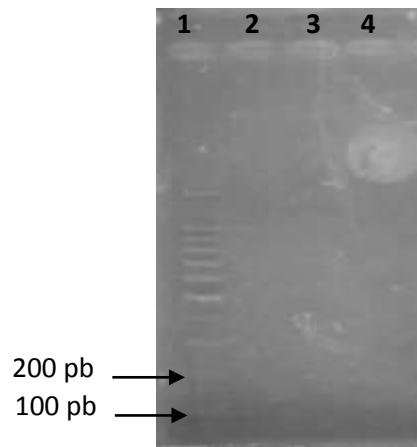


Figura 12: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores *nad5* siguiendo el protocolo de Li y colaboradores (2006). Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 2: producto de PCR. Carril 3: ADN de equino sano. Carril 4: agua.

Por lo tanto, fue realizado un ensayo de PCR en gradiente de temperatura de hibridación. Fueron probadas las siguientes temperaturas: 57°C; 57,9°C; 59,3°C; 60,4°C; 61,1°C y 62°C. En este ensayo, fue usado únicamente ADN molde de TeAp-N/D1 como control positivo. Sin embargo, tampoco observamos el amplicón esperado con ninguna de las temperaturas de hibridación probadas (Figura 13).

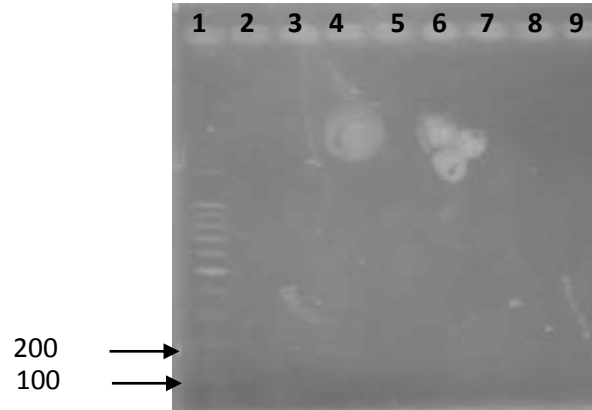


Figura 13: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR en gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores *nad5*, siguiendo el protocolo de Li y colaboradores (2006). Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 2: producto de PCR con 57°C de temperatura de hibridación. Carril 3: producto de PCR con 57,9°C de temperatura de hibridación. Carril 4: producto de PCR con 59,3°C de temperatura de hibridación. Carril 5: producto de PCR con 60,4°C de temperatura de hibridación. Carril 6: producto de PCR con 60,4°C de temperatura de hibridación. Carril 7: producto de PCR con 61,1°C de temperatura de hibridación. Carril 8: producto de PCR con 62°C de temperatura de hibridación. Carril 9: agua.

Nuevamente fue usado como base el protocolo descrito por Sánchez y colaboradores (2015), esta vez para realizar un ensayo de PCR en gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores mitocondriales *nad5*. En este caso, el gradiente de temperatura de hibridación estaba conformado por las siguientes temperaturas: 55,5°C; 57,2°C; 58,9°C y 60,5°C. Igual que en el ensayo anterior, fue usado únicamente ADN molde de TeAp-N/D1 como control positivo, observándose un producto de PCR de aproximadamente 165 pb en todo el gradiente de temperatura empleado (Figura 14).

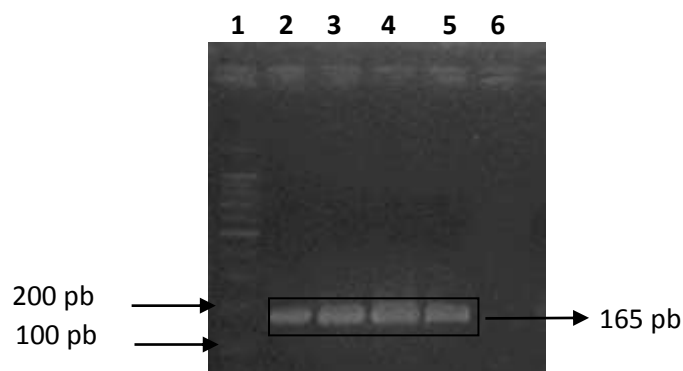


Figura 14: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR en gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores *nad5*, siguiendo el protocolo Sánchez y colaboradores (2015). Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 2: producto de PCR con 55,5°C de temperatura de hibridación. Carril 3: producto de PCR con 57,2°C de temperatura de hibridación. Carril 4: producto de PCR con 58,9°C de temperatura de hibridación. Carril 5: producto de PCR con 60,5°C de temperatura de hibridación. Carril 6: agua.

Basándose en el resultado obtenido anteriormente, fue modificada a 55,5°C la temperatura de hibridación del protocolo descrito por Sánchez y colaboradores (2015) y se realizó nuevamente el ensayo de PCR para corroborar que se tratase del producto de PCR esperado. Para esto fue utilizado como control positivo el mismo ADN molde usado anteriormente. Esta vez fue añadido ADN de equino sano como control negativo y agua como control de la PCR. En la figura 15 se puede observar el resultado obtenido.

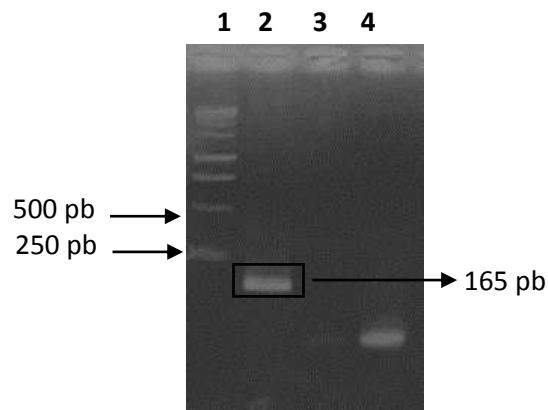


Figura 15: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores *nad5*, siguiendo el protocolo de Sánchez y colaboradores (2015), con una temperatura de hibridación de 55,5°C. Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: producto de PCR. Carril 3: ADN de equino sano. Carril 4: agua.

Fue lograda la amplificación de un producto de PCR de aproximadamente 165 pb en el carril correspondiente a la muestra usada como control positivo (Figura 15) durante el ensayo con los cebadores mitocondriales *nad5*.

Para la estandarización con los cebadores mitocondriales *12SrRNA* se partió también del protocolo descrito por Sánchez y colaboradores (2015). Para esto fue realizado un ensayo de PCR en gradiente de temperatura de hibridación, usando las siguientes temperaturas: 57,6°C; 58,9°C; 60,4°C; 61,3°C. Fue utilizado como control positivo ADN molde de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), únicamente. El resultado obtenido puede ser observado en la siguiente figura:

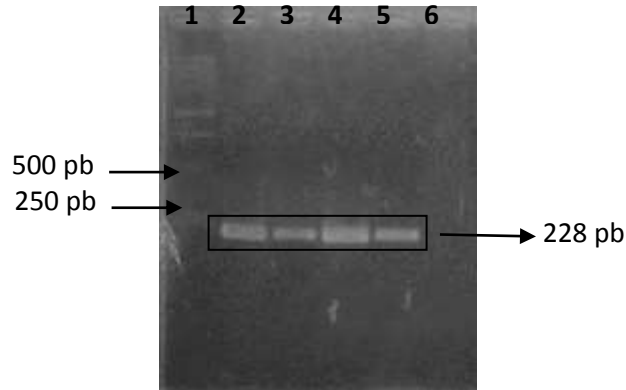


Figura 16: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR en gradiente de temperatura de hibridación con los cebadores *12SrRNA*. Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: producto de PCR con 57,6°C de temperatura de hibridación. Carril 3: producto de PCR con 58,9°C de temperatura de hibridación. Carril 4: producto de PCR con 60,4°C de temperatura de hibridación. Carril 5: producto de PCR con 61,3°C de temperatura de hibridación. Carril 6: agua.

Debido a que se observó el amplicón esperado de aproximadamente 228 pb a lo largo de todo el gradiente utilizado (Figura 16), fue tomado los 57,6°C como temperatura de hibridación del programa.

Posteriormente, fue realizado otro ensayo de PCR con los cebadores mitocondriales *12SrRNA* para asegurar que el producto de PCR obtenido se tratase del amplicón esperado. Para eso fue utilizado como control positivo ADN de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), ADN de equino sano como control negativo y agua como control del ensayo. El resultado obtenido puede ser observado en la figura 17.

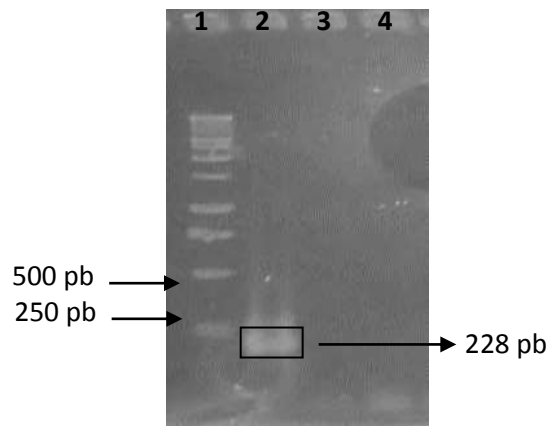


Figura 17: Análisis por electroforesis en gel de agarosa para evaluar el producto de PCR con los cebadores *12SrRNA*, con una temperatura de hibridación de 57,6°C. Gel de agarosa al 2% p/v preteñido con SYBR® Safe gel stain. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: producto de PCR. Carril 3: ADN de equino sano. Carril 4: agua.

Igualmente, en este caso evidenció la amplificación de un producto de PCR en el carril correspondiente a la muestra usada como control positivo durante el ensayo con los cebadores mitocondriales *12srRNA* (Figura 17).

5.4 Comparación de sensibilidad y especificidad del diagnóstico molecular.

Durante el ensayo de sensibilidad se determinó que la cantidad de ADN de TeAp-N/D1 mínima necesaria para poder garantizar la amplificación del producto de PCR con los cebadores *cytb* es de 0,1 ng (Figura 18a). Mientras con los ensayos de sensibilidad utilizando los cebadores mitocondriales *cox1*, *nad5* y *12SrRNA* pudo determinarse que la cantidad de ADN de TeAp-N/D1 mínima necesaria para poder garantizar la amplificación del producto de PCR es de 0,01 ng, en todos los casos (Figura 18b, 18c y 18d).

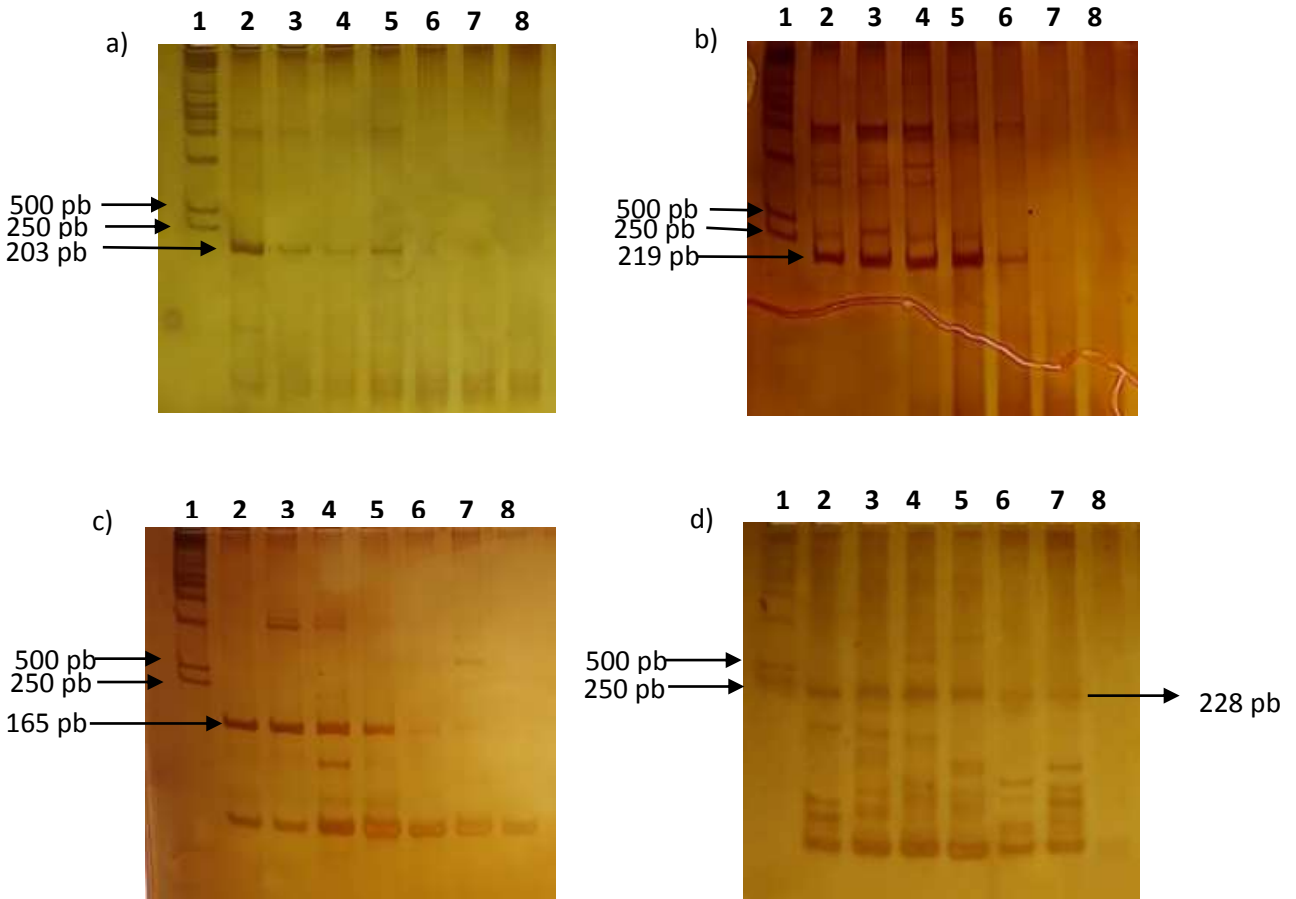


Figura 18: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida para evaluar la sensibilidad de la PCR con los cebadores a) *cytb*, b) *cox1*, c) *nad5* y d) *12SrRNA*.. Gel de acrilamida al 15% p/v teñido con nitrato de plata. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Carril 2: 100 ng de ADN. Carril 3: 10 ng de ADN. Carril 4: 1 ng de ADN. Carril 5: 0,1 ng de ADN. Carril 6: 0,01 ng de ADN. Carril 7: 0,001 ng de ADN. Carril 8: agua.

Posterior a determinar el límite de detección de ADN que posee cada par de cebadores mitocondriales, se procedió a comprobar la especificidad de estos, con la finalidad de demostrar si los cebadores eran específicos para *T. equiperdum*. Durante la realización de estos ensayos, fue usado ADN de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1) como control positivo, como controles negativos fueron usados ADN de distintos aislados venezolanos de *T. evansi*, ADN del

aislado venezolano de *T. vivax* y ADN de equino sano, además de agua como control del ensayo. Los resultados obtenidos con estos ensayos se muestran a continuación:

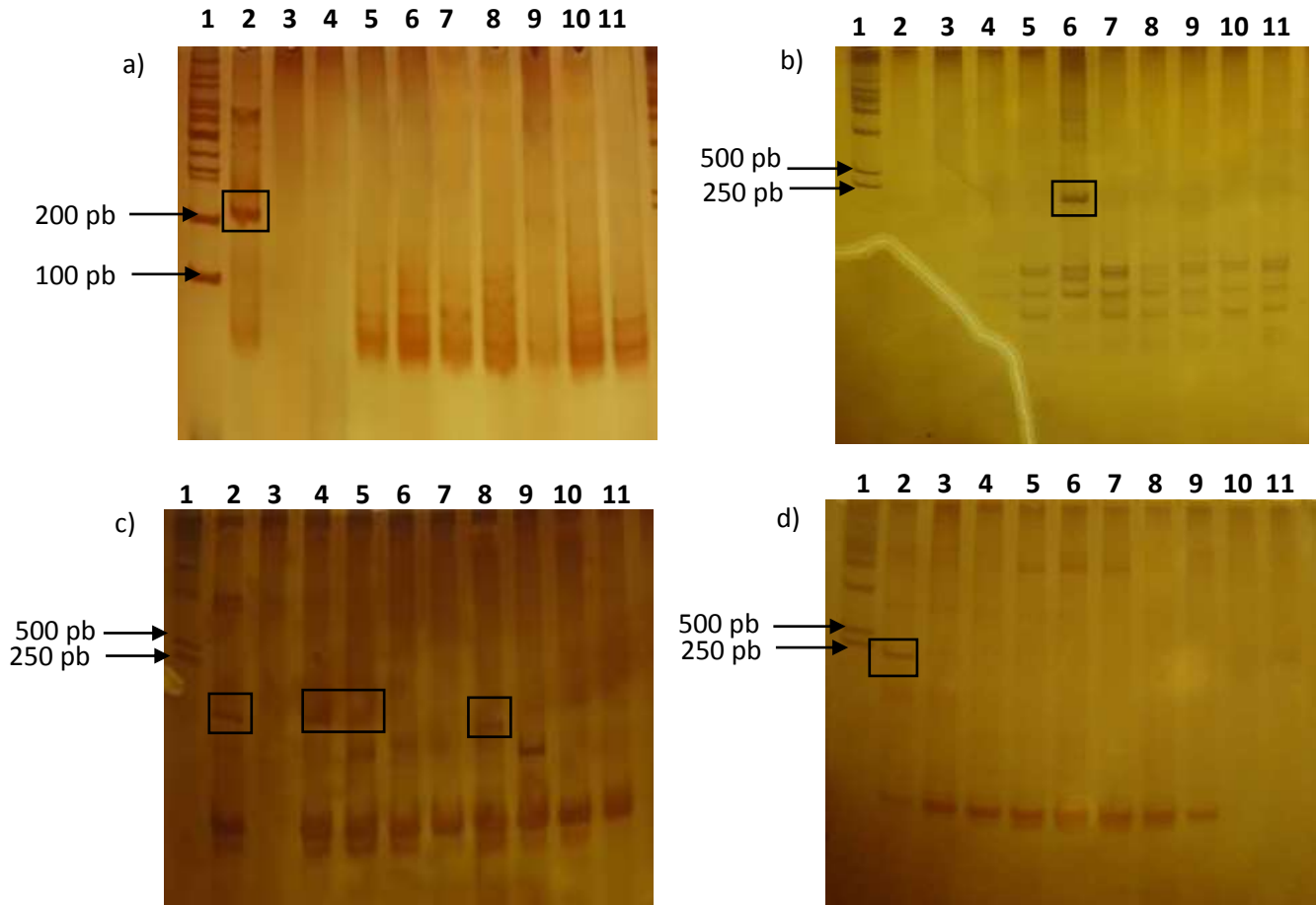


Figura 19: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida para evaluar la especificidad de la PCR con los cebadores a) *cytb*, b) *cox1*, c) *nad5* y d) *12SrRNA*. Gel de acrilamida al 15% p/v teñido con nitrato de plata. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular: a) 100 pb, b, c y d) 1 kb (Promega). Carril 2: TeAp-N/D1. Carril 3: TeAp-ElFrio01. Carril 4: TeGu-02. Carril 5: TeGu-Terecay323. Carril 6: TeAp-Cedral05. Carril 7: TeGu-Terecay03. Carril 8: TeAp-Mantecal01. Carril 9: TvLi. Carril 10: equino sano. Carril 11: agua.

Se obtuvo como resultado los cebadores mitocondriales *cytb* y *12SrRNA* amplificaron solamente el producto de PCR con la muestra usada como control positivo, es decir, el ensayo de PCR con este par de cebadores resultó ser

específico para *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1), siendo incapaz de amplificar otro hemoparásito distinto a *T. equiperdum* (Figura 18a y 18d).

En el ensayo de especificidad de la PCR con los cebadores *cox1* no se observa el amplicón esperado encontrar en el carril correspondiente a la muestra usada como control positivo (*T. equiperdum*, cepa TeAp-N/D1), a pesar de haberse logrado la amplificación del producto de PCR durante los ensayos de estandarización (Figura 11) y de sensibilidad (Figura 18b). Sin embargo, se observa una amplificación en el carril correspondiente a la muestra de ADN de *T. evansi*, cepa TeAp-Cedral05 (Figura 19b). Este resultado no pudo ser corroborado con otra ronda de PCR debido a que se poseía como limitante la cantidad de la enzima *Taq* polimerasa nacional disponible.

En el caso del ensayo de especificidad con los *nad5* se consiguió la amplificación del producto de PCR en el carril correspondiente a la muestra de ADN de TeAp-N/D1 y de TeGu-02 (TeGu-N/D1), ambas cepas de *T. equiperdum*. También se observó el amplicón esperado en los carriles correspondientes al ADN de TeGu-Terecay323 y TeAp-Mantecal01, clasificadas como cepa de *T. evansi* (Figura 19c). Comprobando de esta forma que este par de cebadores mitocondriales no son específicos para *T. equiperdum*.

Con estos ensayos, se determinó que los cebadores mitocondriales *12SrRNA* resultaron ser los que poseían mayor sensibilidad y especificidad entre los cebadores diseñados en este trabajo.

5.5 Diagnóstico molecular de muestras de ADN de equino infectado experimentalmente.

Fue realizado un diagnóstico molecular a 25 muestras de ADN provenientes de una infección experimental de un equino con *T. equiperdum*, cepa TeAp-N/D1, realizada por el grupo del Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos en el año 2013, pero antes fueron analizados los datos obtenidos del registro de parasitemia, temperatura corporal y hematocritos del equino obtenido durante toda la infección.

En la siguiente figura se observa la parasitemia y temperatura corporal presentada por el equino a lo largo de la infección.

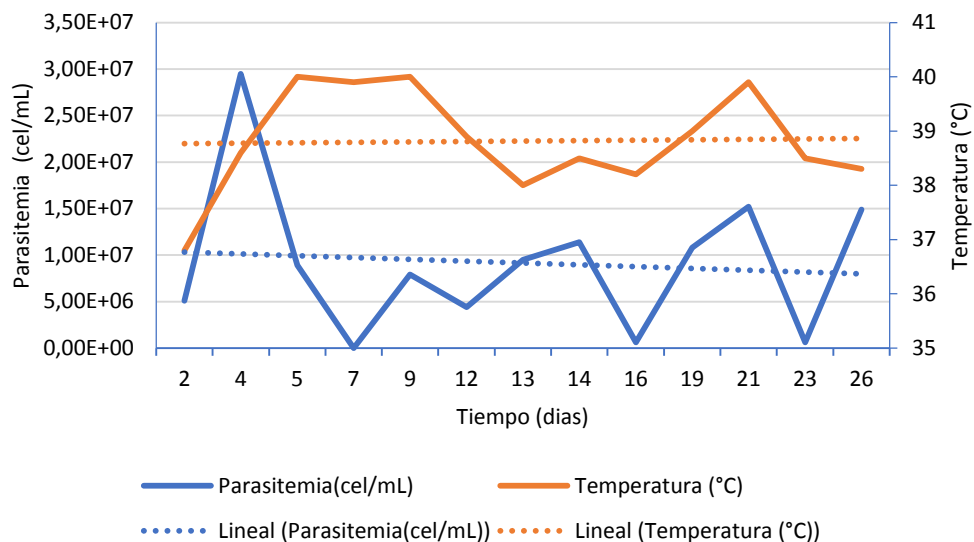


Figura 20: Parasitemia y Temperatura del equino a lo largo de toda la infección experimental con *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1).

La presencia de parásitos en el torrente circulatorio tiende a disminuir a medida que avanza la infección. Durante esta infección experimental es posible

detallar variaciones a lo largo de la misma, produciéndose un pico máximo en el día cuatro postinfección y llegando a encontrarse 0 parásitos en el día siete. También, se detalla el aumento de la temperatura en el equino justo luego de la infección experimental. La fiebre presentada por el animal es moderada, aunque se observan pequeños ciclos de mejoría y empeoramiento a lo largo de la infección, coincidiendo las variaciones de temperatura con los picos de parasitemia presentados por el equino (Figura 20).

Igualmente, al equino se le fue realizado un recuento de hematocritos a lo largo de la infección, el cual se puede detallar en la siguiente figura:

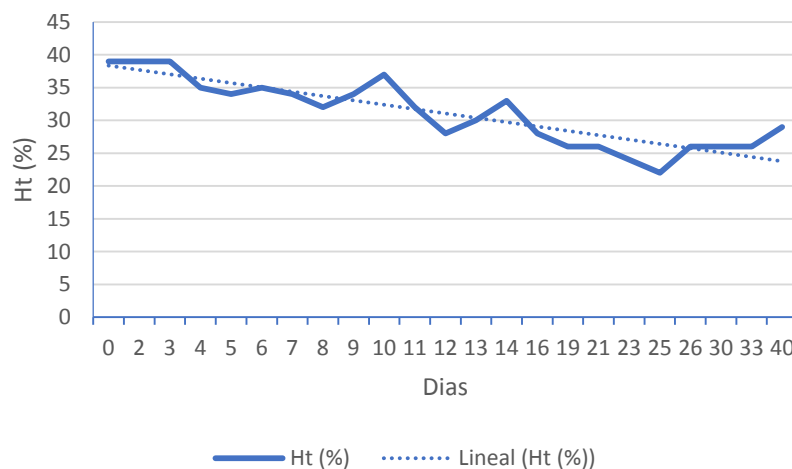


Figura 21: Registro de hematocritos presentado por el equino a lo largo de la infección experimental con *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1).

Se observa una disminución en la cantidad de glóbulos rojos presentes en la sangre a medida que avanza el periodo de infección registrado en el equino, llegando a presentarse un porcentaje de hematocritos por debajo del 30%,

percibiéndose un aumento de la anemia en el animal a medida que avanza la infección experimental con *T. equiperdum* (Figura 21).

Finalmente, fue realizado el diagnóstico molecular de las muestras de ADN provenientes de la infección experimental con *T. equiperdum*, cepa TeAp-N/D1. Debido a que el par de cebadores mitocondriales *12SrRNA* fue el que arrojó mayor sensibilidad y especificidad en el ensayo de PCR fue usado en el diagnóstico molecular.

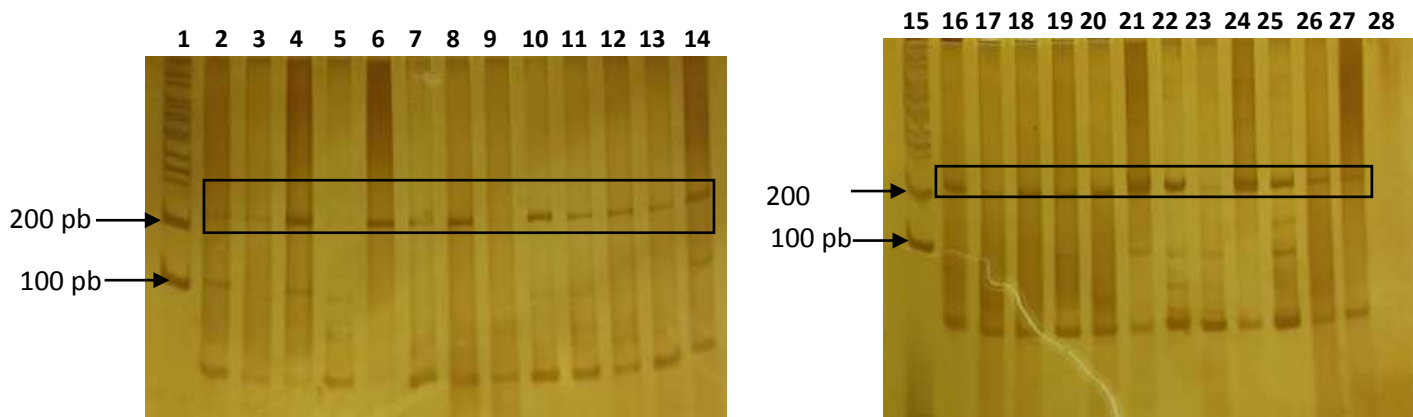


Figura 22: Análisis por electroforesis en gel de acrilamida para evaluar el diagnóstico, a través de PCR con los cebadores *12SrRNA*, de las muestras provenientes de la infección experimental con *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1) Gel de acrilamida al 15% p/v teñido con nitrato de plata. Leyenda: Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 2: preinfección. (Desde el carril 3 al 28: días postinfección) Carril 3: día 2. Carril 4: día 3. Carril 5: día 3*. Carril 6: día 4. Carril 7: día 4*. Carril 8: día 5. Carril 9: día 7. Carril 10: día 9. Carril 11: día 10*. Carril 12: día 11. Carril 13: día 12. Carril 14: día 13. Carril 15: marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Carril 16: día 13*. Carril 17: día 14. Carril 18: día 16. Carril 19: día 16*. Carril 20: día 19. Carril 21: día 21. Carril 22: día 21*. Carril 23: día 23. Carril 24: día 26. Carril 25: día 26*. Carril 26: día 33. Carril 27: día 36. Carril 28: agua (*= ADN re-extraído).

Al relacionar este resultado con los reportados de la parasitemia, es posible observar que en el día siete postinfección el análisis molecular fue capaz de detectar la presencia del parásito, a pesar de percibirse una banda muy tenue, mientras que el reporte registrado de parasitemia es de 0 parásitos en ese mismo día. Mientras que, al relacionar los resultados del análisis molecular con los de la

prueba de hematocritos fue posible determinar que la anemia presentada en el equino a lo largo de la infección experimental es causada por la presencia detectada de *T. equiperdum* en el animal (Figura 22).

6. DISCUSIÓN.

El *Trypanosoma equiperdum* es causante de una enfermedad de transmisión sexual entre équidos, llamada Durina, la cual posee una amplia distribución a nivel mundial. Esta enfermedad compromete la vida de los animales infectados. Es la única tripanosomosis que no se transmite a través de un insecto vector y afecta principalmente el tejido genital.

El maxicírculo representa la molécula de mayor tamaño en la red mitocondrial de los tripanosomas, se encuentra conformada por una región variable y otra conservada en secuencia que codifica para subunidades del ARN ribosomal y una serie de proteínas, que en su mayoría son subunidades de los complejos respiratorios, por lo que la función del maxicírculo está estrechamente ligada al ciclo de vida de los tripanosomas (Shapiro, 1993; Lukes y col., 2005; Wei y col., 2011; Carnes y col., 2015).

A nivel molecular, el *Trypanosoma evansi* se caracteriza por la pérdida completa de los maxicírculos del ADN del kinetoplasto, mientras que el *T. equiperdum* ha retenido fragmentos de maxicírculos similares a los presentes en *Trypanosoma brucei* (Borst y col., 1987; Lai y col., 2008). Por tanto, los análisis de diagnóstico molecular permiten diferenciar parásitos que son indistinguibles a nivel morfológico, tales como *T. equiperdum* y *T. evansi*.

Debido a que en este estudio fueron diseñados y usados cebadores que no se encuentran reportados, los ensayos de PCR partieron de condiciones reportadas en protocolos descritos para ensayos de PCR usando cebadores

mitocondriales basados en secuencias del maxicírculo, como los descritos por Li y colaboradores (2006), además del protocolo de Sánchez y colaboradores (2015), y dependiendo del resultado obtenido se realizaron modificaciones en los mismos, tales como variaciones en la temperatura de hibridación y en la concentración de cebadores, con la finalidad de obtener la temperatura de hibridación ideal y conseguir que el ensayo de PCR fuera específico.

Para obtener la temperatura de hibridación ideal, en los casos que fue necesario, fueron realizados ensayos de PCR en gradiente de temperatura de hibridación tomando en cuenta la temperatura de hibridación reportada por cada par de cebadores, debido a que esta se refiere a la temperatura en la que se unen los cebadores a los sitios que son complementarios (Tamay de Dios y col., 2013; <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf> [Consultado: 03/04/19]).

La concentración de cebadores es otro elemento importante durante la realización de los ensayos de PCR, ya que si la concentración es elevada podrían formarse productos inespecíficos o dímeros de cebadores. Mientras que si la concentración es baja puede no observarse el amplicón esperado, debido a que disminuye el rendimiento de la PCR. Esto fue observado durante la estandarización con los cebadores mitocondriales *nad5*, en donde inicialmente no se observó el amplicón esperado, lo que pudo deberse a la diferencia de concentración de cebadores usados en los protocolos empleados por Li y colaboradores (2006) y Sánchez y colaboradores (2015), los cuales reportaron el uso de una concentración de cebadores de 0,2 μM y 0,8 μM , respectivamente. Al

realizar el cambio de protocolo, y por ende al aumentar la concentración de cebadores, fue posible observar la amplificación esperada.

Luego de determinar la temperatura de hibridación y la concentración de los cebadores adecuada se logró obtener el amplicón esperado en cada reacción con los cebadores probados.

Una vez estandarizados los programas para los ensayos de diagnóstico molecular de *T. equiperdum* basados en reacciones de PCR, se procedió a realizar la evaluación de la sensibilidad de cada par de cebadores mitocondriales basados en las distintas regiones del maxicírculo: *cytb*, *cox1*, *nad5* y *12SrRNA*.

Se determinó que los cebadores basados en la secuencia del gen mitocondrial *12SrRNA*, *cox1* y *nad5*, diseñados en este estudio, fueron capaces de detectar 7,6 células de *T. equiperdum* en el ADN genómico purificado, por lo que son considerados como los cebadores mitocondriales que poseen mayor sensibilidad para el diagnóstico molecular.

Li y colaboradores determinaron que los cebadores que usaron derivados de la secuencia del gen *nad5* de maxicírculo de *T. brucei* fueron capaces de detectar de 20-25 células de *T. brucei* o *T. equiperdum* (Li y col., 2007). Siendo así los cebadores diseñados y usados en este estudio más sensibles que los usados por Li y colaboradores en su estudio.

Por otra parte, debido a que en el sur de Brasil fue reportado el primer brote de *T. vivax* en caballos, una región no endémica donde se había encontrado bovinos infectados por esta especie de tripanosoma (Da Silva y col., 2011), el cual

es un parásito que pertenece al género *Trypanosoma*, al igual que *T. evansi* y *T. equiperdum* y que además posee un kinetoplasto, conformado por maxicírculos y minicírculos, al igual que *T. equiperdum*, en este trabajo fue probada la especificidad de cada par de cebadores mitocondriales diseñados usando como controles ADN de distintas cepas de *T. evansi* y ADN del aislado venezolano de *T. vivax* Liem, del cual se sabe que posee dos secuencias completas de genes mitocondriales que se corresponden con la subunidad 8 de la NADH deshidrogenasa y la subunidad 6 de la ATPasa (Cardozo, 2012). Se buscó la presencia de genes conservados en el maxicírculo de los tripanosomas, como el citocromo b, el citocromo oxidasa subunidad 1, la NADH dehidrogenasa subunidad 5 y la subunidad 12S del ARNr, en todas las cepas analizadas.

Los cebadores basados en la secuencia de los genes *cytb* y *12SrRNA* resultaron ser específicos para *T. equiperdum*, debido a que fueron incapaces de amplificar otro hemoparásito distinto de este o al mismo hospedero, lo que pudiera indicar la ausencia de estas regiones en el maxicírculo en la cepa de *T. vivax* estudiada, y corroborando así la ausencia de maxicírculo en las cepas de *T. evansi*.

Sin embargo, los cebadores basados en la secuencia del gen *cox1* fueron capaces de amplificar el ADN correspondiente a la cepa TeAp-Cedral05, la cual había sido clasificada por Sánchez y colaboradores (2015) como una cepa de *T. evansi*, luego de realizar ensayos de microsatélite y no obtener amplificación del ADN con pares de cebadores basados en la región *cytb* y *cox1* del maxicírculo (Sánchez y col., 2015). A pesar de que Sánchez y colaboradores (2015) diseñaran

cebadores mitocondriales basados en la secuencia del gen *cox1* del maxicírculo mediante una alineación múltiple de secuencias de TeAp-N/D1, no es posible asegurar que la cepa TeAp-Cedral05 posea una ausencia completa o parcial del maxicírculo hasta que se realice una secuenciación del genoma completo de este aislado.

En cambio, los cebadores mitocondriales basados en el gen *nad5* fueron capaces de amplificar esta región en las cepas TeGu-Terecay323 y TeAp-Mantecal01, clasificadas como *T. evansi* (Sánchez y col., 2015), aunque estos no estudiaron esta región del maxicírculo. Por lo que, posiblemente estas cepas hayan retenido dicho fragmento del maxicírculo y estén mal clasificada como una cepa de *T. evansi*, debido a que el *Trypanosoma evansi* se caracteriza por la pérdida completa de los maxicírculos del ADN del kinetoplasto. En este ensayo de PCR también amplificó la muestra de ADN correspondiente a la cepa TeAp-N/D1 y a la cepa TeGu-02, la cual es común a la cepa de *T. equiperdum* TeGu-N/D1, caracterizada por Sánchez y colaboradores (2015) indicando que dichas muestras han retenido el fragmento del gen *nad5* del maxicírculo.

La falta de amplificación de los genes mitocondriales *cytb*, *cox1*, *nad5* y *12SrRNA* en la cepa de *T. vivax* puede deberse a la falta de especificidad por parte de los cebadores utilizados al no encontrar regiones homólogas en el ADNk, debido a variaciones en la secuencia del aislado venezolano. A pesar de que se pensara que la población de maxicírculos dentro de una única mitocondria era homogénea en tamaño y secuencia, fue demostrado que pueden ocurrir cambios drásticos en el kinetoplasto de diferentes cepas de *L. mexicana amazonensis*

seleccionadas de cultivos *in vitro*, específicamente en el gen que codifica para *cytb* (Lee y col., 1992).

Por otra parte, alinear las secuencias del ADNr y compararlas en diferentes organismos ha proporcionado gran información acerca de las relaciones filogenéticas, debido a que las diferentes regiones de la unidad de repetición del ADNr evolucionan a velocidades muy diferentes, por lo que son útiles en el planteamiento de hipótesis de relaciones filogenéticas de taxas con tiempos de divergencia muy antiguos (Hillis y col., 1991; Fernández y col., 1993; Alcántara, 2007).

Los estudios de filogenia que utilizan las secuencias de las subunidades pequeñas del ADNr han permitido determinar relaciones a niveles de filos y clases. El ARNr más estudiado es el gen nuclear de subunidad pequeña, *18SrRNA*, que contiene un solo tipo de ARNr. Análisis filogenéticos basados en la secuencia de dicha región dentro del género *Trypanosoma* lo han dividido en 2 grandes grupos: sección Salivaria y sección Stercoraria. Además, ha permitido diferenciar a las especies pertenecientes al subgénero *Trypanozoon* de *T. vivax* y *T. congolense* (Büscher y col., 2019). Sugiriendo así que dicho género no es monofilético y que los parásitos de vertebrados han evolucionado más de una vez dentro de la familia de *Trypanosomatidae* (Maslov y col., 1996; Hughes y col., 2003).

Distinguir a las especies pertenecientes al subgénero *Trypanozoon* es más complicado. Los genes de ARNr de las mitocondrias pueden estudiarse dentro de un grupo particular para dilucidar las filogenias de taxones más

estrechamente relacionados. Los marcadores de ADNm más utilizados son el *12SrRNA* y el *cytb*, por ser altamente conservados. Debido a sus tasas de evolución más rápidas en comparación con los genes de ARN ribosomal, los genes codificadores de proteínas mitocondriales se consideran marcadores potentes para el análisis de diversidad genética en niveles categóricos más bajos, incluidas las familias, los géneros y las especies (Arif y col., 2009), por lo que ensayos de PCR basados en el ADNm de estos parásitos pueden potencialmente distinguir *T. evansi* de *T. equiperdum* y *T. brucei*, debido a la ausencia de maxicírculos en su ADNk (Büscher y col., 2019).

Luego de determinar que los cebadores mitocondriales basados en el gen *12SrRNA* fueron los que arrojaron mayor sensibilidad y especificidad durante el diagnóstico molecular fueron usados al momento de realizar el diagnóstico de las muestras de ADN provenientes del equino infectado experimentalmente, teniendo en cuenta que los métodos de diagnóstico clínico son fundamentales para la evaluación del estado físico del animal, consistiendo en el estudio de la condición corporal, así como la evaluación de los parámetros hematológicos y la medición de la temperatura del animal (OIE, 2013).

Las técnicas de detección o identificación de parásitos son altamente específicas. Sin embargo, su sensibilidad es altamente variable durante el curso de la infección. En las fases iniciales de la misma, la sensibilidad es alta debido a que los parásitos están multiplicándose constantemente, coincidiendo con lo observado en el inicio de la infección experimental con TeAp-N/D1 reportada en este trabajo, en donde se observa el mayor pico de parasitemia.

Durante la fase crónica de la infección la sensibilidad es baja, causada por la respuesta inmune del hospedador, momento en el cual los parásitos son escasos y rara vez vistos en sangre (OIE, 2008), por lo cual se observa una disminución en la parasitemia en el equino durante la infección experimental.

El nivel de parasitemia en animales infectados por *T. equiperdum* pueden fluctuar entre 10^6 parásitos/mL y 0,000001 parásitos/ μ L, debido a que son parásitos que residen en los tejidos (Desquesnes y col., 2002), coincidiendo con la variación de parasitemia obtenida durante la infección experimental reportada en este estudio. Además, los signos clínicos de la enfermedad producida por este parásito se caracterizan por el empeoramiento y las recaídas periódicas, como lo observado en las variaciones de temperatura y en los valores de hematocritos registrados en el animal analizado en este trabajo

Infecciones experimentales en caballos con *T. equiperdum* han sido realizadas en Suráfrica usando la cepa OVI, en Estados Unidos usando cepas Americanas y Canadienses y en Kazajistán usando una cepa salvaje. En el estudio de Estados Unidos ningún caballo infectado desarrollo signos clínicos de Durina, solamente desarrollaron signos clínicos de tripanosomosis. En Suráfrica y Kazajistán los animales mostraron los signos clínicos de la enfermedad (Claes, 2005). En la infección experimental realizada en este trabajo con la cepa TeAp-N/D1, el caballo mostró los signos clínicos de Durina, como edema e inflamación de los genitales, fiebre, anemia. Sin embargo, aún no se tiene claro si estas diferencias pueden estar relacionadas con la cepa de *T. equiperdum* usada o si

son causadas por las diferencias en la respuesta inmune del hospedador (Claes y col., 2005).

Para un diagnóstico regular, la sensibilidad de la PCR ha incrementado con el desarrollo de nuevas tecnologías, logrando detectar 1 tripanosoma por mililitro de sangre (Desquesnes y col., 2002). En este trabajo esto pudo ser comprobado ya que al séptimo día postinfección no fue detectado la presencia de ningún parásito en la sangre del equino al realizar la observación directa por microscopio. Sin embargo, al momento de realizar el análisis molecular de dicha muestra se detectó la presencia del parásito en la misma, lo cual representa un aumento en sensibilidad del diagnóstico al compararlo con la técnica de observación directa por microscopio

Por tanto, se recomienda que el diagnóstico de Durina sea confirmado utilizando ensayos parasitológicos, serológicos y moleculares (Gari y col., 2010).

7. CONCLUSIONES.

- 1) La presencia de los genes conservados en la estructura del maxicírculo del ADN mitocondrial de *Trypanosoma equiperdum* constituye por sí sola en una herramienta de diagnóstico valiosa, debido a que la estructura del maxicírculo es homogénea para individuos de una misma especie, siendo así capaz de discernir entre las especies pertenecientes al subgénero *Trypanozoon*.
- 2) Los cebadores mitocondriales diseñados junto a la enzima *Taq* polimerasa nacional usada en este trabajo permitieron la realización del diagnóstico molecular de *T. equiperdum* (cepa TeAp-N/D1).
- 3) La cepa de *Trypanosoma equiperdum* TeAp-N/D1 ha retenido fragmentos del maxicírculo correspondientes a las regiones de los genes *cytb*, *cox1*, *nad5* y *12SrRNA*.
- 4) El par de cebadores mitocondriales *12SrRNA* es especie-específico y es óptimo en termino de sensibilidad, por lo que puede ser usado como herramienta de diagnóstico basado en la detección de ADN de *T. equiperdum*.
- 5) Los análisis de diagnóstico molecular mediante ensayos de PCR permiten diferenciar parásitos que son indistinguibles a nivel morfológico, con una elevada capacidad de detección y una especificidad determinada por la secuencia de los cebadores utilizados.

8. RECOMENDACIONES.

- ✓ Repetir el ensayo de especificidad de la PCR con los cebadores mitocondriales *cox1*, la finalidad de comprobar la amplificación del ADN de la cepa TeAp-N/D1 de *T. equiperdum*. Además de comprobar si la cepa TeAp-Cedral05 se trata realmente de una cepa de *T. equiperdum* o no.
- ✓ Realizar análisis mediante PCR basados en genes mitocondriales con la finalidad de caracterizar y clasificar las cepas TeGu-Terecay323 y TeAp-Mantecal01.
- ✓ Secuenciar el fragmento amplificado con los cebadores mitocondriales *nad5* de la cepa TvLi.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- ✓ Alcántara, M. R. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 541-566.
- ✓ Arif, I. A., Khan, H. A. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal biodiversity and conservation*, 32(1), 9-17.
- ✓ Brener, Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4(6), 389-96.
- ✓ Bonfini, B., Tittarelli, M., Luciani, M., Di Pancrazio, C., Rodomonti, D., Iannetti, L., Di Febo, T. 2018. Development of an indirect ELISA for the serological diagnosis of dourine. *Veterinary parasitology*, 261, 86-90.
- ✓ Borst, P., Fase-Fowler, F., Gibson, W. C. 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 23(1), 31-38.
- ✓ Brun, R., Hecker, H., Lun, Z. R. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary parasitology*, 79(2), 95-107.
- ✓ Büscher, P., Gonzatti, M. I., Hébert, L., Inoue, N., Pascucci, I., Schnauffer, A., Van Reet, N. 2019. Equine trypanosomosis: enigmas and diagnostic challenges. *Parasites & vectors*, 12(1), 234.
- ✓ Cardozo, I. 2012. Caracterización del kinetoplasto de tres aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis de Maestría. Centro De Estudios

Avanzados Instituto Venezolano De Investigaciones Cientificas (I.V.I.C).
Altos de Pipe, Venezuela.

- ✓ Carnes, J., Anupama, A., Balmer, O., Jackson, A., Lewis, M., Brown, R., Imamura, H. 2015. Genome and phylogenetic analyses of *Trypanosoma evansi* reveal extensive similarity to *T. brucei* and multiple independent origins for dyskinetoplasty. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(1), e3404.
- ✓ Claes, F., Büscher, P., Touratier, L., Goddeeris, B. M. 2005. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake?. *Trends in parasitology*, 21(7), 316-321.
- ✓ Clausen, P. H., Chuluun, S., Sodnomdarjaa, R., Greiner, M., Noeckler, K., Staak, C., Schein, E. 2003. A field study to estimate the prevalence of *Trypanosoma equiperdum* in Mongolian horses. *Veterinary Parasitology*, 115(1), 9-18.
- ✓ Da Silva, A. S., Perez, H. A. G., Costa, M. M., França, R. T., De Gasperi, D., Zanette, R. A., Monteiro, S. G. 2011. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitology research*, 108(1), 23-30.
- ✓ Davaasuren, B., Yamagishi, J., Mizushima, D., Narantsatsral, S., Otgonsuren, D., Myagmarsuren, P., Sukanuma, K. 2019. Draft Genome Sequence of *Trypanosoma equiperdum* Strain IVM-t1. *Microbiol Resour Announc*, 8(9), e01119-18.

- ✓ Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.
- ✓ Desquesnes, M., Dávila, A. M. R., 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes. A review and perspectives. *Veterinary Parasitology*, 109, 213–231
- ✓ Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D. H., Dargantes, A., Lun, Z. R., Jittaplapong, S. 2013. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *BioMed Research International*.
- ✓ Fernández, A. P., Nelson, K., Beverley, S. M. 1993. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origins of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(24), 11608-11612.
- ✓ Gari, F. R., Ashenafi, H., Tola, A., Goddeeris, B. M., Claes, F. 2010. Comparative diagnosis of parasitological, serological, and molecular tests in dourine-suspected horses. *Tropical Animal Health and Production*, 42(8), 1649-1654.
- ✓ Giardina, S., Paganico, G., Urbani, G., Rossi, M. 2003. A biochemical and immunological comparative study on *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Research Communications*, 27(4), 289-300.

- ✓ Gillingwater, K., Büscher, P., Brun, R. 2007. Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. *Veterinary parasitology*, 148(2), 114-121.
- ✓ Giordani, F., Morrison, L. J., Rowan, T. G., De Koning, H. P., Barrett, M. P. 2016. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 143(14), 1862-1889.
- ✓ Gizaw, Y., Megersa, M., Fayera, T. 2017. Dourine: a neglected disease of equids. *Tropical Animal Health and Production*, 1-11.
- ✓ Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., Reyna-Bello, A. 2014. *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* and typanosomosis in LatinAmerica: secadera/huequera/cacho hueco. In *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261-285). Springer Vienna.
- ✓ Hébert, L., Bouziane Moumen, A. M., Steinbiss, S., Lakhdar, L., Van Reet, N., Büscher, P., Petry, S. 2017. First Draft Genome Sequence of the Dourine Causative Agent: *Trypanosoma equiperdum* Strain OVI. *Journal of genomics*, 5, 1.
- ✓ Hillis, D. M., Dixon, M. T. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly review of biology*, 66(4), 411-453.
- ✓ Holland, W. G., Claes, F., My, L. N., Thanh, N. G., Tam, P. T., Verloo, D., Vercruysse, J. 2001. A comparative evaluation of parasitological tests and a

PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 97(1), 23-33.

- ✓ Hughes, A. L., Piontkivska, H. 2003. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) based on 18S rRNA: evidence for paraphyly of *Trypanosoma* and six other genera. *Molecular biology and evolution*, 20(4), 644-652.
- ✓ Jensen, R. E., Simpson, L., Englund, P. T. 2008. What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. *Trends in parasitology*, 24(10), 428-431.
- ✓ Lai, D. H., Hashimi, H., Lun, Z. R., Ayala, F. J., Lukeš, J. 2008. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(6), 1999-2004.
- ✓ Lanham, S. M., Godfrey, D. G. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, 28(3), 521-534.
- ✓ Lee, S.Y., Lee, S.T., Chang, K.P. 1992. "Transkinetoplastidy—A Novel Phenomenon Involving Bulk Alterations of Mitochondrion-Kinetoplast DNA of a Trypanosomatid Protozoan" *Journal of Eukaryotic Microbiology* 39(1): 190-196.
- ✓ Li, F. J., Gasser, R. B., Lai, D. H., Claes, F., Zhu, X. Q., Lun, Z. R. 2007. PCR approach for the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. equiperdum*

and their differentiation from *T. evansi* based on maxicircle kinetoplast DNA. *Molecular and Cellular Probes*, 21(1), 1-7.

- ✓ Luckins, A. G. 1977. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Tropical Animal Health and Production*, 9(1), 53-62.
- ✓ Luckins, A. G., Mehlitz, D. 1978. Evaluation of an indirect fluorescent antibody test, enzyme-linked immunosorbent assay and quantification of immunoglobulins in the diagnosis of bovine trypanosomiasis. *Tropical Animal Health and Production*, 10(1), 149-159.
- ✓ Lukeš, J., Hashimi, H., & Zíková, A. 2005. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current genetics*, 48(5), 277-299.
- ✓ Lumsden, W. H. R., Kimber, C. D., Evans, D. A., y Doig, S. J. 1979. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(3), 312-317.
- ✓ Lun, Z. R., Lai, D. H., Li, F. J., Lukeš, J., Ayala, F. J. 2010. *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. *Trends in parasitology*, 26(9), 424-427.
- ✓ Maslov, D. A., Lukeš, J., Jirku, M., Simpson, L. 1996. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. *Molecular and biochemical parasitology*, 75(2), 197-205.

- ✓ Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2008. (<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>)
- ✓ Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). 2013. (http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.05.03_DOURINE.pdf).
- ✓ Ou, Y.C., Giroud, C., Baltz, T. 1991. "Kinetoplast DNA analysis of four *Trypanosoma evansi* strain". Mol. Biochem. Parasitol. 46: 97-102.
- ✓ Pascucci, I., Di Provvido, A., Cammà, C., Di Francesco, G., Calistri, P., Tittarelli, M., Caporale, V. 2013. Diagnosis of dourine in outbreaks in Italy. *Veterinary Parasitology*, 193(1), 30-38.
- ✓ Perrone, T. M., Gonzatti, M. I., Villamizar, G., Escalante, A., Aso, P. M. 2009. Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma* spp. by random amplified polymorphic DNA method. *Veterinary Parasitology*, 161(3), 194-200.
- ✓ Posso, D., y Ghneim, T. 2009. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida. Protocolos de laboratorio UEG Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe. Venezuela. Disponible en línea: <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/>. [Consultado:23/11/17].
- ✓ Pruvot, M., Kamyngkird, K., Desquesnes, M., Sarataphan, N., Jittapalapong, S. 2010. A comparison of six primer sets for detection of

Trypanosoma evansi by polymerase chain reaction in rodents and Thai livestock. *Veterinary parasitology*, 171(3), 185-193.

- ✓ Sánchez, E., Perrone, T., Recchimuzzi, G., Cardozo, I., Biteau, N., Aso, P. M., Gonzatti, M. I. 2015. Molecular characterization and classification of *Trypanosoma* spp. Venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplastmaxicircle genes. *Parasites & Vectors*, 8(1), 536.
- ✓ Schnauffer, A., Domingo, G. J., Stuart, K. 2002. Natural and induced dyskinetoplastictrypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. *International Journal for Parasitology*, 32(9), 1071-1084.
- ✓ Shapiro, T. A. 1993. Kinetoplast DNA maxicircles: networks within networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7809-7813.
- ✓ Songa, E. B., Hamers, R. 1988. A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*. In *Annales de la Société belge de médecine tropicale* (Vol. 68, No. 3, pp. 233-240).
- ✓ Sukanuma, K., Narantsatsral, S., Battur, B., Yamasaki, S., Otgonsuren, D., Musinguzi, S. P., Inoue, N. 2016. Isolation, cultivation and molecular characterization of a new *Trypanosoma equiperdum* strain in Mongolia. *Parasites & vectors*, 9(1), 481.
- ✓ Wei Y., Wen Y., Desquesnes M., Zhao-RongLun. 2011: Molecular epidemiology of *T. evansi* and *T. equiperdum* and atypical human infection by animal trypanosomes. Madame Curie Report. ©2011 Landes Bioscience.

- ✓ Westenberger, S. J., Cerqueira, G. C., El-Sayed, N. M., Zingales, B., Campbell, D. A., y Sturm, N. R. 2006. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species-and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. *BMC genomics*, 7(1), 60.
- ✓ Woo, P. T. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*, 47(5), 921-923.

Consulta en línea:

- ✓ (<http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>)
[Consultado: 02/03/19].
- ✓ <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/530/cap17.pdf> [Consultado:
03/04/19].