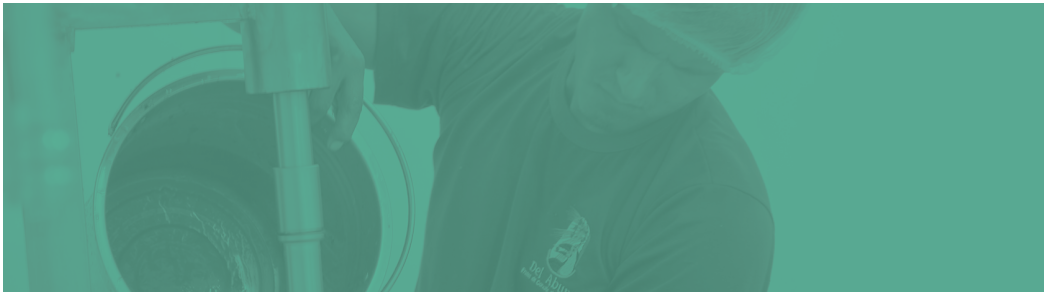
ASAÍ Y CHAGAS: MITO O REALIDAD

Detección molecular del parásito causante del Chagas en frutos y pulpa de asaí

Pando – Bolivia
2022



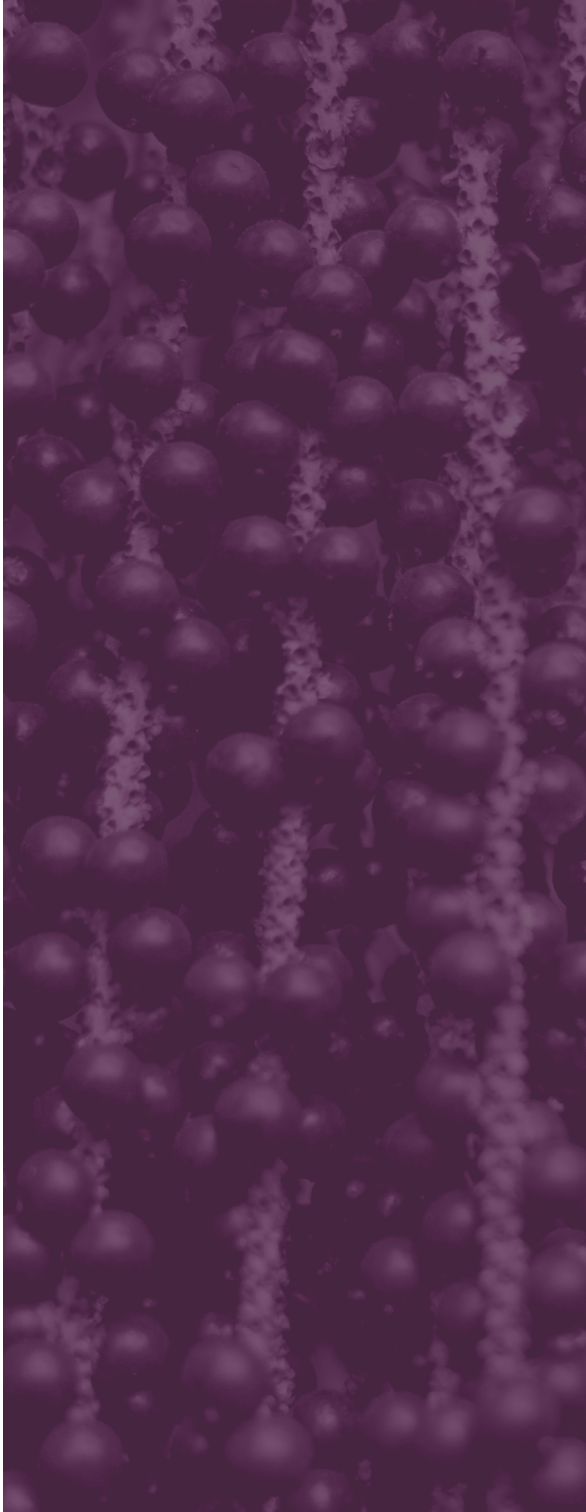
GOBIERNO AUTÓNOMO DEPARTAMENTAL DE PANDO
GESTIÓN: DR. REGIS RICHTER ALENCAR

PANDO Avanza

SERVICIO DEPARTAMENTAL PRODUCTIVO AMAZÓNICO DE ASISTENCIA TÉCNICA, VETERINARIA Y FORESTAL "SEDEPRO" GOBIERNO AUTÓNOMO DEPARTAMENTAL DE PANDO

PICFA
PLATAFORMA INTER-INSTITUCIONAL DE ARTICULACIÓN DE COMPLEJOS PRODUCTIVOS DE FRUTOS AMAZÓNICOS

FEDAFAP PANDO



Elaborado por:

aceaa
CONSERVACIÓN AMAZÓNICA

Financiado por:

WWF

cooperación alemana
DEUTSCHE ZUSAMMENARBEIT

ANDES AMAZON FUND

Autores: Oscar Rollano, Patricia Mollinedo, Misael Campos, Javier Pinto, Daniel M. Larrea
Editores: Karen Losantos-Ramos, Daniel M. Larrea
Fotos: ACEAA, FEDAFAP, WWF-Bolivia.
Diseño y diagramación: Mg. Gabriel Fernández
Depósito Legal: 4-2-1609-2022
ISBN: 978-9917-9889-4-6

Cita sugerida:
PICFA (2022). Asaí y Chagas: Mito o Realidad. Detección molecular del parásito causante del Chagas en frutos y pulpa de asaí. Gobierno Autónomo Departamental de Pando (GADP), Servicio Departamental de Asistencia Tecnica Integral y Promocion del Empleo (SEDEPRO), Federación de Asaí y Frutos Amazónicos del departamento de Pando (FEDAFAP), ACEAA-Conservacion Amazonica, World Wildlife Fund (WWF-Bolivia), SWEBOL S.R.L., Pando, Bolivia, 20 p.

ASAÍ Y CHAGAS: MITO O REALIDAD

Detección molecular del parásito causante del Chagas en frutos y pulpa de asaí

Pando – Bolivia
2022

Este reporte técnico forma parte del proyecto: "*Fortalecimiento de capacidades productivas sostenibles en comunidades de la Reserva Nacional de Vida Silvestre Amazónica Manuripi, Pando, Bolivia*" que fue implementado por la Asociación Boliviana para la Investigación y Conservación de Ecosistemas Andino-Amazónicos (ACEAA-Conservación Amazónica) en colaboración con SWEBOL BIOTECH A.B. S.R.L., en el marco del Acuerdo de Concesión Nro. OE79 firmado entre WWF-Bolivia y ACEAA-Conservación Amazónica, con el cual se desarrolló el protocolo de detección y los resultados para las pulpas de asaí. Una etapa adicional vinculada con el análisis de frutos de asaí fue cubierta con fondos de Andes Amazon Fund (AAF) a través de ACEAA-Conservación Amazónica. Es un documento generado en el marco de las actividades desarrolladas por la Plataforma Inter-Institucional de Articulación de Complejos Productivos de Frutos Amazónicos de Pando (PICFA), en coordinación con la Federación Departamental de Asaí y Frutos Amazónicos de Pando (FEDAFAP).

MAKAWA
Del Abumá

Presentación

La economía basada en la recolección, transformación y venta de productos forestales no maderables forma parte de la historia y el pasado reciente del norte de Bolivia. La historia de la castaña inicia en la década de 1920, pero fue durante los años 60s que alcanzaría su primer auge con aproximadamente 5 mil millones de toneladas de exportación, volumen que se mantuvo relativamente constante hasta inicios de los años 80s, donde la conformación de empresas beneficiadoras en Riberalta y Cobija consolidaría una capacidad de procesamiento que terminaría por despegar a la industria como hoy la conocemos con casi 20 mil toneladas exportadas anualmente. Muchas de las prácticas usadas en nuestros días para la contratación de la fuerza de trabajo en la castaña ("zafreros") son un legado de la época del caucho, incluyendo la participación de barracas (hoy propiedades privadas) y la vigencia del habilito. La gran diferencia está en la presencia hoy de comunidades campesinas, un actor fundamental de la Amazonia contemporánea que ha emprendido otro desafío colosal, ser la base productiva e impulsor de otro recurso, la producción y venta de pulpa de asaí.

En los últimos años ha surgido un sobresalto ocasionado con la posible transmisión oral del Chagas por el consumo de frutos o pulpa de asaí *(Euterpe precatoria)*. Esta forma de transmisión de la enfermedad es poco común y tiene diferentes tipos. Mientras que con la transmisión vectorial (la forma más común y conocida de infección de esta enfermedad) los síntomas pueden ocurrir luego de 15-20 años, en la transmisión por vía oral el periodo de incubación oscila entre 3 y 22 días, produciendo fiebres, mialgias, vómitos y otros síntomas que pueden persistir entre cuatro y ocho semanas y dar pie a otras complicaciones. Si esta forma de transmisión fuese común en la Amazonía boliviana, es plausible pensar que la ocurrencia de brotes de la enfermedad debería ser frecuente; lo cual, al parecer, no ha ocurrido. Aún no existe en Bolivia evidencia científica que demuestre que el consumo de frutos de asaí produce Chagas, lo cual implica actuar con responsabilidad y no causar pánico afectando al mercado interno que empieza a crecer.

En este sentido, el trabajo conjunto entre científicos, productores y cosechadores de asaí será clave no solo para mejorar la calidad del producto, sino también para generar adecuadas medidas de prevención y control. El aprovechamiento de asaí se ha consolidado como una importante alternativa económica para la Amazonía, y nos ha obligado a reflexionar sobre la responsabilidad que implica desarrollar emprendimientos productivos directamente relacionados con la alimentación y la salud de las personas. En este documento presentamos un protocolo de detección molecular del protozoario causante del Chagas y resultados de su aplicación en frutos y pulpa de asaí en diferentes emprendimientos campesinos de Pando.

La enfermedad del Chagas y el consumo de asaí

En los años recientes el asaí ha generado un gran interés a nivel nacional e internacional por su alto valor agregado, abriendo la puerta a mercados emergentes y constituyéndose en una importante alternativa económica para la Amazonía. En Bolivia, la especie bajo aprovechamiento es el asaí solitario *(Euterpe precatoria)* que se produce en la Amazonía norte boliviana (Pando) y es aprovechada por asociaciones productoras locales.

En Brasil dónde se aprovecha el asaí de macollo *(Euterpe olerásea)*, existe un mercado grande y creciente de transformación del asaí entre otros frutos amazónicos que ambos países comparten. Esta relación ha traído beneficios para el país a través de la importación de maquinaria, pero al mismo tiempo ha generado algunas incógnitas siendo que Brasil presenta varios casos de enfermedades endémicas, entre ellas el Chagas y aunque la transmisión oral de esta enfermedad no es usual se han presentado algunos brotes en el país vecino. Se considera que dichos casos se debieron al consumo de alimentos contaminados en su mayoría atribuibles a producción artesanal sin normas adecuadas de higiene.

A razón de los casos positivos que se han ido registrando en Brasil y la proximidad que tiene nuestro país en sitios de producción de asaí, el año 2010 se generó una falsa sin base sobre casos confirmados de Chagas por consumo de asaí en Bolivia, una noticia que sin evidencia afectó al mercado interno. A raíz de este brote se realizaron los análisis que determinaron que el brote de 16 casos en una comu-

Cosecha segura de frutos de asaí en Santa Rosa del Abuná, Pando.

nidad cerca a la ciudad de Guayaramerín (Beni, Bolivia) fue causado por consumo de leche de majo artesanal sin medidas adecuadas de higiene (Duran, 2014). Aun así, inicialmente se le atribuyó la causa al asaí, aunque fue después desmentido y al momento no existe ninguna evidencia científica que demuestre casos de Chagas asociados al consumo de este alimento.

Esta situación ha abierto un nuevo espacio de discusión y reflexión sobre la complejidad en el desarrollo de emprendimientos productivos, así como en la necesidad de acciones conjuntas entre científicos, productores y cosechadores de asaí que permita establecer controles de calidad del producto y así control de la enfermedad para su prevención y que a la vez garanticen al consumidor que los procesos de transformación de asaí cumplen con las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) por parte de los emprendimientos campesinos con transformación dedicados a la producción y venta de pulpa de asaí en Pando.

Selección de frutos de asaí en la despulpadora (ASICOPTA, Santa Rosa del Abuná, Pando).

Pulpa congelada de asaí producida por dos iniciativas campesinas de Pando:
1) Trinchera producida por ARPFAT (bolsa de 1 kg.) y
2) Pulpas Abuná productida por ASICOPTA (bolsa de 500 g.).

¿Qué sabemos del Chagas?

La enfermedad de Chagas (o también conocida como Tripanosomiasis americana), es una enfermedad parasitaria endémica de América y se constituye en uno de los problemas más importantes de salud pública en el continente americano y regiones amazónicas causando incapacidad en personas infectadas y mata a más personas por año que cualquier otra enfermedad parasitaria en la región. Actualmente en Bolivia se presenta en las regiones de chaco boliviano, valles interandinos y Amazonía con 60% del territorio nacional endémico para Chagas (Figura 1).

Es causada por el parásito protozoario conocido como ***Trypanosoma cruzi*** que al ingresar al organismo se aloja en tejidos de órganos donde se reproduce. Este parásito es transmitido por un insecto vector del orden Hemíptera comúnmente llamado vinchuca, chinche o "timbuco", un insecto que se distribuye desde Sudamérica hasta México. Esta enfermedad es potencialmente mortal y puede pasar desapercibida por años incluso décadas como una enfermedad silenciosa, llegando a desarrollar daños a órganos principalmente corazón y sistema digestivo (esófago y colon).

¿Sabías que?

Existen más de 4 millones de personas en riesgo de infección de Chagas en Bolivia

En Bolivia, se han reportado 18 especies de vinchucas que pueden transmitir el Chagas.

La especie de vinchuca más importante es *Triatoma infestans* que aun no ha sido reportada en Pando.

Específicamente en Pando se registran a 6 especies presentes y dos especies de las que se proyecta su presencia (Figura 2). Se conoce que se alimentan o habitan en proximidades de fauna silvestre que incluye *Didelphis marsupialis, Philander oposum, Marmosa cinerea, Coendu prehensilis, Sigmodon* sp, *Tamandua tetradactyla, Cunniculus pacca, Coendu* sp., *Dasypus novemcinctus, Cuniculus paca, Potos flavus,* murciélagos *Micronycteris* sp., *Desmodus rotundus, Phyllostomus elongatus,* roedores *Cricetidae, Muridae, Rhipidomys* sp., aves silvestres y armadillos, también en ambientes domésticos con aves domésticas, perros, puercos y humanos.

En cuanto a palmeras se evidencia su presencia en asociación con *Acrocomia* sp., *Acrocomia sclerocarpa, Copernitia australis, Orbignya speciosa, Jessenia policarpa, Maximiliana regia, Scheelea* sp, *Attalea* sp. *Leopoldina piassaba, Aechmea* sp., también con la bromelia. *Aechmea* sp. y tanto sobre troncos y cáscaras de árboles.

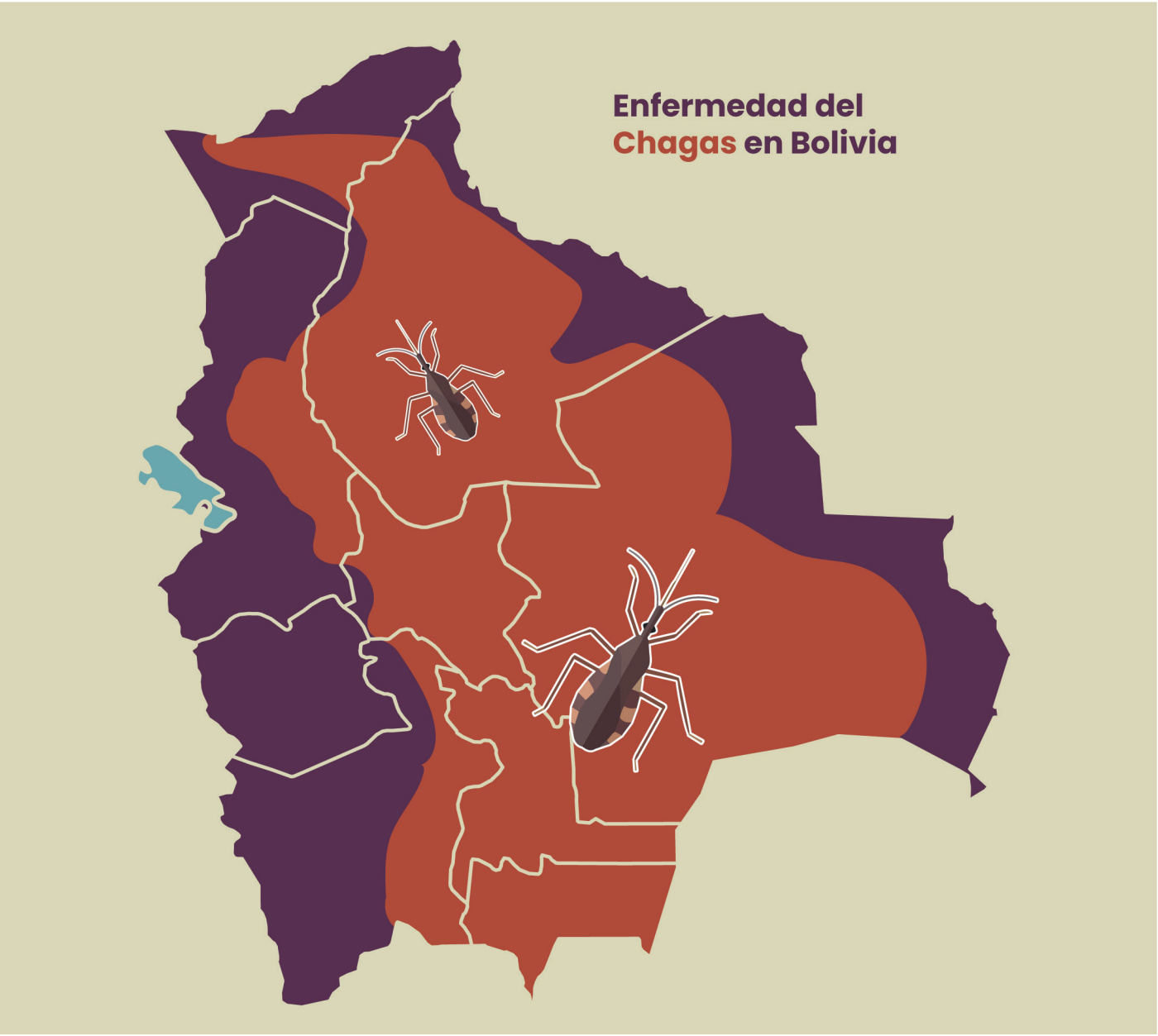


Figura 1: Distribución geográfica de la enfermedad del Chagas en Bolivia.

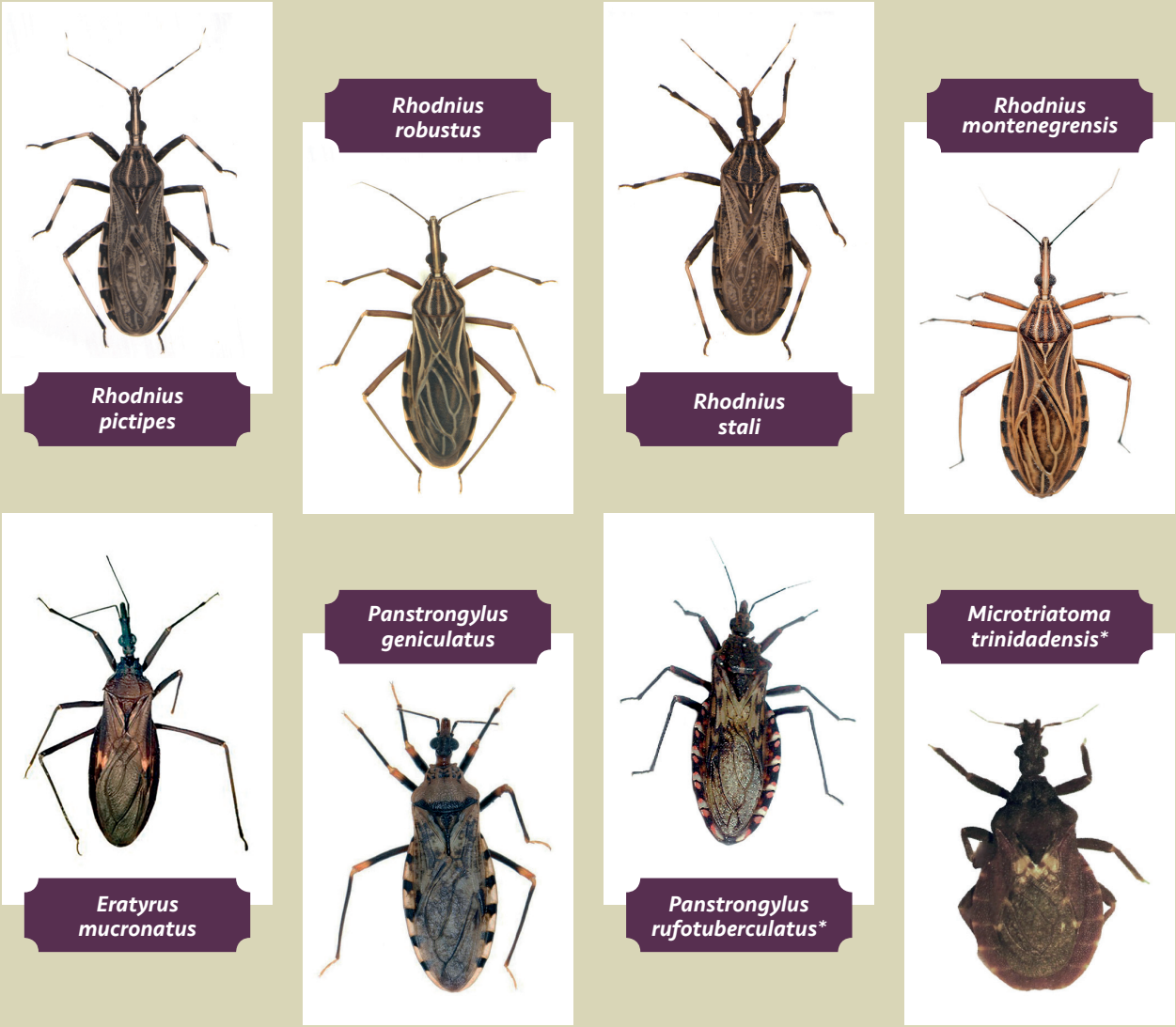


Figura 2. Especies de vinchucas como vectores transmisores del protozoario causante de la enfermedad del Chagas con presencia reportada o probable (*) en el departamento de Pando (Fuentes: Coleção de Triatominae FCFAR – Unesp Araraquara. da Rosa *et al.*, 2012, Páez-Rondón *et al.* 2019, Ribeiro *et al.* 2020, Avendaño-Rangel *et al.* 2014, dos Santos *et al.* 2019).

¿Cómo se transmite el Chagas?

Para comprender el alto riesgo que se presenta para la población en ciertas regiones de Bolivia es preciso conocer las formas en que la enfermedad se transmite. Se habla de diferentes tipos o formas de transmisión que sin embargo están interconectadas en ciclos de transmisión domiciliario, peri-domiciliario y silvestre.

La **transmisión vectorial** es la forma más usual y conocida de infección a humanos y animales, es a través de un insecto vector del grupo de los Triatominos o mejor conocido como vinchuca. Una vez que la vinchuca infectada pica a una persona usualmente defeca cerca de la picadura de forma que cuando la persona rasca su piel las heces del insecto y la picadura quedan en contacto y el parásito ingresa al cuerpo. Es usual encontrar vinchucas en casas junto con la madera, leña u hojas de palma utilizadas para la construcción de paredes y techos.

La **transmisión sanguínea,** puede transmitirse por transfusiones de sangre o trasplante de órganos, casos que ocurren esencialmente en países donde la enfermedad no es endémica como sucede en fuera de Latinoamérica.

La **transmisión materno-fetal,** una persona embarazada puede transmitir la enfermedad al bebé que se denomina también transfusión congénita que en los últimos 5 años se ha registrado entre 1,5-2,3%.

La **transmisión oral,** aunque poco conocida la enfermedad también puede transmitirse a través de alimento contaminado con heces de triatominos, ingesta de triatominos triturados, ingesta de carne de animales infectados que no se cocina lo suficiente para matar al parásito, alimentos contaminados por secreciones de marsupiales infectados *(Didelphis marsupialis)* o animales domésticos.

Entre estas cuatro formas de transmisión, las tres primeras son reconocidas como las más usuales y extendidas, mientras que la transmisión oral ha sido más bien considerada rara y escasa, sin embargo, en los últimos años ha llamado la atención por la aparición de pequeños brotes asociados a la ingesta de bebidas o alimentos contaminados con el parásito especialmente en la región amazónica de Sudamérica. Tal es el brote que se habría reportado en Guayaramerín (Beni) con 16 casos simultáneos por el consumo de leche de majo *(Oenocarpus bataua)* artesanal y del que se han hecho estudios para comprobar las vías de contagio. Y aunque en Brasil ha habido casos de transmisión oral de Chagas por diferentes palmeras incluyendo el asaí, al momento no existe evidencia de transmisión de Chagas en Bolivia por su consumo.

Clínicamente esta forma de contagio difiere de la vectorial pues su incubación es menor (3-22 días) y se manifiesta con amplia morbilidad y mortalidad comparada con las otras vías de infección presentándose mayormente en las épocas calurosas del año con un aumento de la actividad biológica de los triatominos.

Protocolo de detección molecular de *Trypanosoma cruzi* en asaí

Con el propósito de implementar estrategias de control y prevención dentro de los procesos de transformación de frutos amazónicos que coadyuven a las medidas de vigilancia temprana se desarrolló un protocolo para la detección molecular (ADN) del parásito causante de la enfermedad del Chagas (*Trypanosoma cruzi*) en frutos y pulpa de asaí, específicamente, en *Euterpe precatoria*, especie bajo aprovechamiento en Bolivia. El diseño del protocolo incluyó diferentes etapas que son presentadas en la Figura 3 y descritas a continuación:

Búsqueda y evaluación de primers

Inicialmente se evaluaron diferentes pares de *primers* (cadenas de ácido nucleico) para la detección del parásito causante del Chagas a través de Primer3plus y Perlprimer verificando la ausencia de formación de dímeros que interfieran con la reacción, así como ausencia de reacciones cruzadas. Así se seleccionaron los pares de primers: del gen de la proteína ribosomal 28S (*Tc_28S*) de T. cruzi como marcador (NCBI: AY367122.1) y un marcador de la región del DNA del kinetoplasto (*Tc_kDNA*) que es más sensible que otros genes (NCBI: MN447392.1) (Tabla 1).

Los primers para *E. precatoria* se seleccionaron por revisión de bases de la plataforma National Center for Biotechnology Information entre otras específicamente indagando en genes de proteínas codificantes para esta especie, sin embargo, muchas fueron regiones no conservadas o regiones de microsatélites por lo que se exploró en bases sobre *Euterpe oleracea* o asaí brasilero, de ésta se escogió el gen S16 (*Eo_RpS16*) (NCBI: AJ240889.1) que codifica proteínas ribosomales conservadas[3] en todo el género y que se confirmaron por PCR para *E. precatoria* denominándose *Ep_RpS16* y verificando también en geles de agarosa la ausencia de dímeros (Tabla 1).

Estandarización de método para detección molecular de pulpa de asaí

La pulpa de asaí se extrajo con el kit Purelink Genomic DNA (Thermo, USA), sin nitrógeno líquido con 100µl de muestra de pulpa de asaí descongelada. La extracción se evaluó por PCR en tiempo real con el kit Fast Sybr Green Master Mix (Thermo, USA) suplementado con 0.25 µM de cada primer escogido para asaí.

Estandarización de método para detección molecular de T. cruzi

Fue extraído el ADN de sedimentos de *T. cruzi* cepa Tulahuen (TcII) criopreservados a partir de un cultivo in vitro en células VERO que crecieron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM, Merck, USA). Los sedimentos fueron resuspendidos en buffer de lisis y luego se siguieron las instrucciones del kit Purelink Genomic DNA (Thermo, USA). La extracción se conservó a -20°C y su calidad evaluada por PCR en tiempo real con el kit Fast Sybr Green Master Mix (Thermo, USA) suplementado con 0.25 µM de cada primer escogido.

Estandarización del método para determinación de presencia de T. cruzi en frutos y pulpa de asaí

Se determinó la temperatura óptima de funcionamiento para todos los pares de primers (Tabla 1) y el tiempo reducido de termociclado. El PCR fue realizado con el kit Fast Sybr Green Master Mix (Thermo, USA) suplementado con 0.25 µM de cada primer con las condiciones finales: 1 ciclo de: 95° C, 20 s; 30 ciclos de: (95° C, 3 s; 60°C, 30s) con un volumen de reacción de 10 µl. También se verificó que no haya amplificación cruzada con el genoma de asaí inoculando ADN de T. cruzi en la reacción PCR del gen para detección de asaí y viceversa. También, para simular la infección se inoculó 1ml de pulpa de asaí con 10µl de ADN purificado de T. cruzi. Para verificar el límite de detección se calibró una curva estándar con el gen más sensible (Tc_kDNA) con 5 diluciones de factor 10.

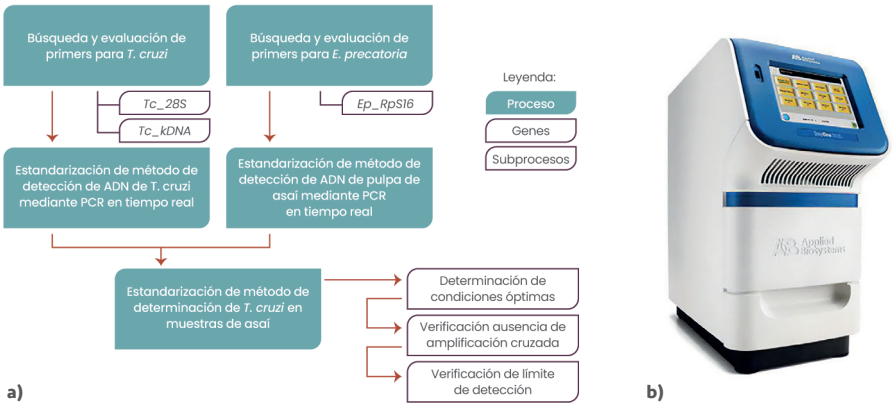


Figura 3: a) Flujograma de las etapas para la estandarización del protocolo de detección molecular de *Trypanosoma cruzi* en frutos y pulpa de asaí *(Euterpe precatoria)*, **b)** Reciclador térmico de PCR (en español RCP: Reacción en Cadena de Polimerasa, www.fishersci.com).

Nombre del Primer	Secuencia del primer	Fuente
Tc_28S_F	AAGGTGCGTCGACAGTGTG	(Vieira, 2015)
Tc_28S_R	TTTTCAGAATGGCCGAACAGT	(Vieira, 2015)
Tc_kDNA_F	TTTGGGAGGGGCGTTCA	(Mattos et al., 2017)
Tc_kDNA_R	ATATTACACCAACCCCAATCGAA	(Mattos et al., 2017)
Ep_RpS16_F	CGAAAGAVGGTTAGAGACGGC	(Vieira, 2015)
Ep_RpS16_R	GAAATCTCATTCGTACTCATAAC	(Vieira, 2015)

Tabla 1: Primers seleccionados para el desarrollo del protocolo de detección molecular del protozoario causante de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) en asaí solitario (*Euterpe precatoria*), Bolivia. *Tc_28S*: gen de la proteína ribosomal 28S de *T. cruzi*; *Tc_kDNA*: gen marcador de la región del DNA del kinetoplasto de *T. cruzi*; *Ep_RpS16*: gen codificante proteínas de ribosomales en *E. precatoria*.

¿Quiénes producen pulpa de asaí en Pando?

En los últimos años la comercialización de la pulpa de asaí ha cobrado cada vez más interés en Pando debido a los beneficios que contiene (presencia de antioxidantes, aminoácidos y minerales como calcio, zinc, magnesio y hierro, además de propiedades antiinflamatorias y aumento de defensas), consolidándose en una importante alternativa económica para las familias campesinas de varias comunidades de Pando, las cuales han conformado asociaciones productivas para comercializar este producto bajo principios de inocuidad alimentaria (Figura 4).

La Federación de Asaí y Frutos Amazónicos del departamento de Pando (FEDAFAP) agrupa a las iniciativas productivas campesinas vinculadas con la producción y venta de pulpa congelada de asaí. Está conformada por siete iniciativas productivas, con personalidad jurídica, ubicadas en los municipios de Filadelfia, Porvenir, Puerto Rico y Santa Rosa del Abuná en Pando. La FEDAFAP forma parte de la Plataforma Inter-Institucional de Articulación de Complejos Productivos de Frutos Amazónicos del departamento de Pando (PICFA). Participó y fue un actor clave en la consulta pública y aprobación de la norma boliviana de pulpa de asaí elaborada por el Instituto Boliviano de Normalización y Calidad (IBNORCA, https://www.ibnorca.org). Además del asaí sus iniciativas han incursionado en el despulpado y comercialización de otros frutos amazónicos como el majo, el copoazú y, próximamente, la palma real.

Figura 4: Ubicación geográfica de las iniciativas productivas u operadores de pulpa de asai del departamento de Pando. **COMUNIDAD DE TRINCHERA** - Asociación de Recolectores, Productores y Transformadores de Frutos Amazónicos de Trinchera (ARPTFAT). **COMUNIDAD DE PETRONILA** - Asociación de Recolectores y Productores de Frutos Amazónicos de Petronila Pando (ARPFAPP). **COMUNIDAD DE VILLA FLORIDA** – Ventana Amazónica S.A. **SUBCENTRAL BERNARDINO RACUA** – Asociación Integral de Productores y Transformadores de Frutos Amazónicos de Pando (AFAI-Pando). **COMUNIDAD DE 1RO DE MAYO** - Asociación Integral de Cosechadores, Productores y Transformadores de Frutos del Abuná (ASICOPTA). **SUBCENTRAL PUERTO MORALES** - Asociación Integral de Productores y Transformadores de Cultivos Amazónicos (AIPROTCA). **COMUNIDAD DE JÉRICO** - Asociación Forestal Integral de Productores Agropecuarios de la Comunidad Jericó (AFIPA-CJ).

Limpieza de frutos de asaí en la iniciativa piloto de la comunidad de Villa Florida de la Reserva Manuripi, Pando.

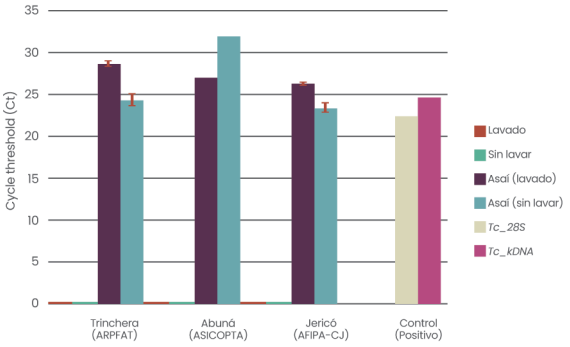
Procesamiento de la pulpa de asaí en la comunidad de Trinchera (ARPFAT), municipio de Porvenir, Pando.

Pruebas de detección del *T. cruzi* en frutos de asaí

Dentro de las primeras etapas clave para la evaluación de contaminación del producto de asaí procesado se considera al fruto cosechado, puesto que al no haber una desinfección hasta este momento podría haber estado en contacto con agentes infecciosos siendo así un punto de contaminación potencial. Una vez cosechado el fruto se procede a su limpieza y desinfección para continuar los pasos siguientes. De esta manera fueron evaluadas muestras de frutos cosechados antes de la limpieza y desinfección y posterior a ella.

Para esta evaluación fueron consideradas tres iniciativas campesinas del departamento de Pando: La Asociación de Recolectores, Productores y Transformadores de Frutos Amazónicos de Trinchera (ARPTFAT), ubicado en la comunidad de Trinchera del municipio de Porvenir; la Asociación Integral de Cosechadores, Productores y Transformadores de Frutos del Abuná (ASICOPTA), ubicada en el municipio de Santa Rosa del Abuná; la Asociación Forestal Integral de Productores Agropecuarios de la Comunidad Jericó (AFIPA-CJ), ubicada en el municipio de Puerto Rico.

Figura 5: Determinación de presencia de *T. cruzi* en muestras de fruto de asaí de las iniciativas productivas. Se considera un control interno de reacción para muestras lavadas y uno para muestras sin lavar por detección del gen de asaí y dos controles positivos para *T.cruzi*.



Para la determinación de presencia de *T. cruzi* en frutos de asaí se hizo un lavado de los frutos muestra con agua miliQ en proporción 2:1 una sola vez, tanto los que dentro del procesamiento están sin lavar y lavados, consecutivamente se filtró el agua residual en una membrana PDVF de 47mm con tamaño de poro de 0,22 µM. Inmediatamente después del filtrado, los filtros con los residuos se remojaron en buffer de lisis y se procedió a la extracción de ADN con el kit Purelink Genomic DNA. La detección se realizó por PCR en tiempo real empleando los dos pares de primers para *T. cruzi* y el par de primers para *E. precatoria* definidos en la estandarización del protocolo. Se utilizó el kit Fast Sybr Green Master Mix con las siguientes condiciones de PCR: 1 ciclo de: 95° C, 20 s; 40 ciclos de: (95° C, 3 s; 60°C, 30s) y se consideraron controles internos para verificar que no hubo inhibición del PCR detectando el gen de asaí para muestras lavadas y no lavadas. Como resultado el método fue validado por la detección del gen de asaí en cada muestra como control interno de reacción y no se observó presencia de *T. cruzi* en ninguna de las muestras lavadas o no lavadas (Figura 5) indicando la inocuidad del producto procesado desde las etapas iniciales dentro del proceso que manejan en los emprendimientos considerados.

Pruebas de detección del *T. cruzi* en pulpa de asaí

Revisión de tamices en el proceso de despulpado de asaí en la comunidad de 1ro de Mayo (ASICOPTA) del municipio de Santa Rosa del Abuná, Pando.

Gracias a la estandarización del protocolo de detección molecular se logró realizar el análisis de las muestras de pulpa de asaí de las iniciativas productivas. Se consideraron cinco emprendimientos productivos dedicados a la comercialización de pulpa de asaí en el departamento de Pando: La Asociación de Recolectores, Productores y Transformadores de Frutos Amazónicos de Trinchera (ARPFAT), ubicado en la comunidad de Trinchera del municipio de Porvenir; la experiencia piloto ubicada en la comunidad de Villa Florida, municipio de Filadelfia, en la Reserva Nacional de Vida Silvestre Amazónica Manuripi vinculada a la Asociación Integral Extractivista de Frutos Amazónicos Reserva Manuripi (ASINEFARM) y la empresa privada Ventana Amazónica; la Asociación Integral de Cosechadores, Productores y Transformadores de Frutos del Abuná (ASICOPTA), ubicada en el municipio de Santa Rosa del Abuná; la Asociación Forestal Integral de Productores Agropecuarios de la Comunidad Jericó (AFIPA-CJ), ubicada en el municipio de Puerto Rico; y, del emprendimiento privado Amazonic Asai, ubicado en la ciudad de Cobija.

Para ello fueron empleados los primers para detección de *T. cruzi* (*Tc_28S* y *Tc_kDNA*) bajo las condiciones previamente establecidas con las muestras de pulpa de asaí de las cinco iniciativas, utilizando el kit Fast Sybr Green Master Mix con las condiciones de PCR: 1 ciclo de: 95° C, 20 s; 30 ciclos de: (95° C, 3 s; 60°C, 30s). También adicionalmente se comprobó la efectividad de la reacción de detección con un control positivo consistente en muestras de parásitos criopreservados de *T. cruzi*. Como resultado de esta prueba de detección en ninguna de las muestras se detectó la presencia de ADN de *T. cruzi* (Figura 6 y 7), por lo cual no representan riesgo para la salud pública y confirma el cumpliendo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y de Almacenamiento (BPA) por parte de los emprendimientos.

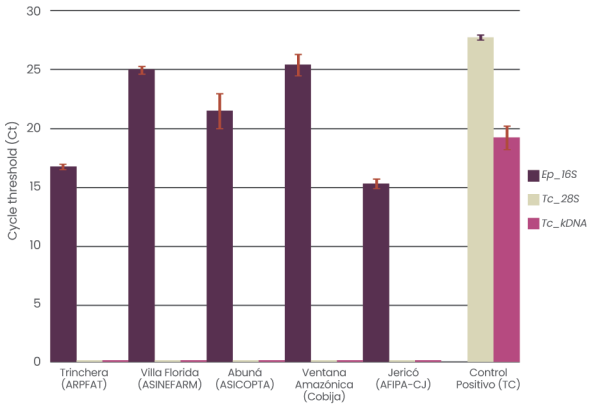


Figura 6: Determinación de presencia del protozoario causante del Chagas *(Tripanosoma cruzi)* en muestras de pulpa de asaí *(Euterpe precatoria)* en cinco iniciativas productivas del departamento de Pando. Se consideraron dos controles positivos para *T. cruzi*. No se detectó presencia del ADN del protozoario en ninguna de las muestras.

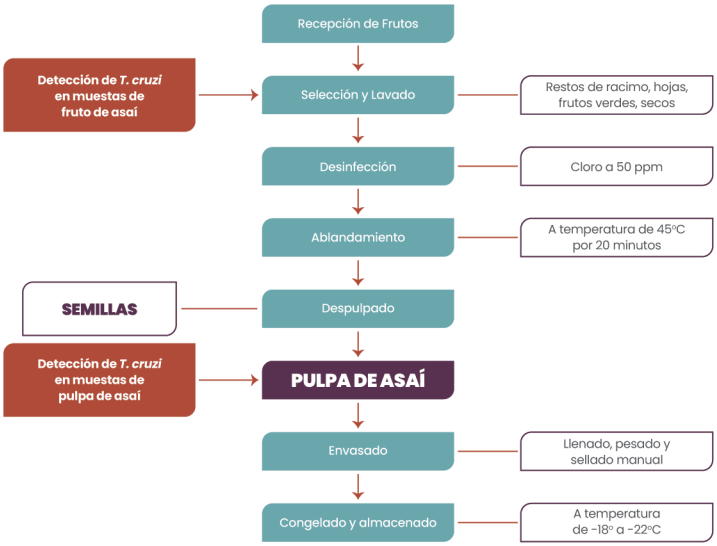


Figura 7: Flujograma del procesamiento de frutos de asaí para obtención de la pulpa. El diagrama incluye los puntos del proceso de donde se tomaron las muestras para análisis de detección del protozoario causante de la enfermedad del Chagas, especificamente, en los frutos que llegan a la despulpadora y la pulpa resultante del proceso.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) recomienda un golpe de calor de 80° C por 10 segundos para eliminar completamente al protozoario luego de la selección y lavado de los frutos.

Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos con el diseño e implementación del protocolo para la detección molecular del parásito causante de la enfermedad de Chagas, se sugiere:

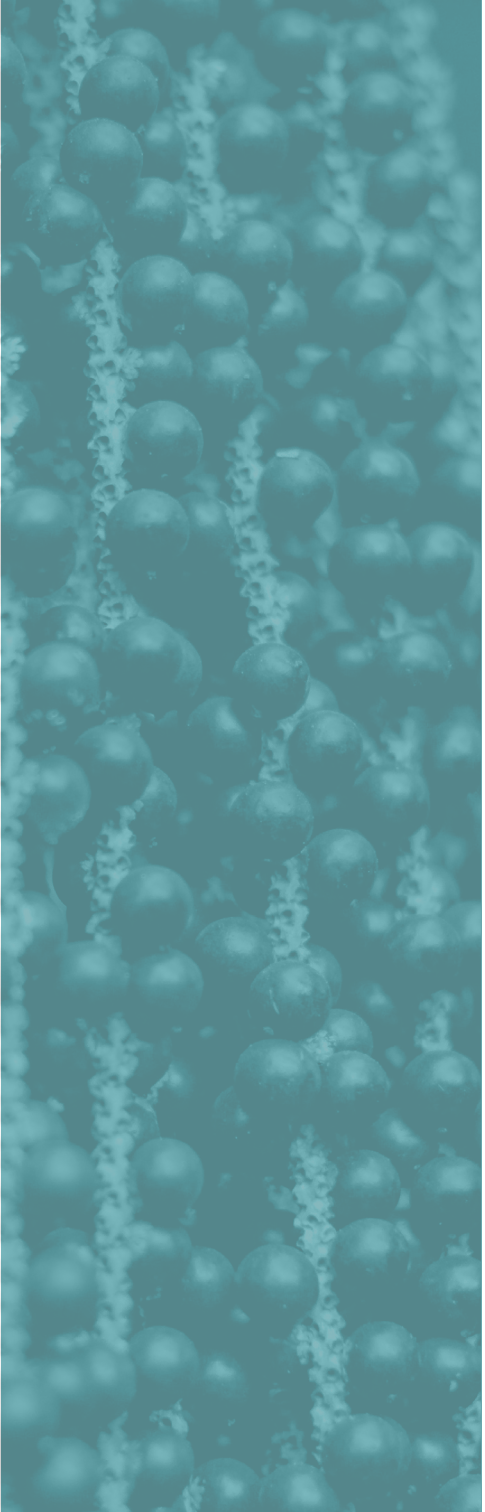
» Dar continuidad y fortalecer las buenas prácticas de higiene en la elaboración de la pulpa de asaí, específicamente, la aplicación del golpe de calor de 80˚C por 10 segundos sugerido por la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA, https://www.embrapa.br) como práctica preventiva para eliminar la posibilidad de la presencia del parásito en el proceso de elaboración de la pulpa de asaí.

» Diseñar e implementar un Sistema de Monitoreo de Calidad e Inocuidad de Pulpa de Asaí (SMCIA-Asaí) para la FEDAFAP, que incluya el seguimiento de las variables fisicoquímicas, organolépticas y calidad del producto (p.ej. % de sólidos disueltos), junto con el análisis anual de frutos y pulpa de asaí bajo el protocolo presentado en el presente documento.

» Impulsar a través de la FEDAFAP la implementación de buenas prácticas de higiene e inocuidad en la producción y venta local de pulpa de asaí producida artesanalmente.

» Fortalecer a la PICFA como una mesa de articulacion entre actores publicos y privados comprometidos con la la estandarización y normalización de la produccion de productos derivados de frutos amazónicos.

Palmera de asaí *(Euterpe precatoria)* en Pando, Bolivia.



Bibliografía

ACEAA-SWEBOL (2021). Diseño e implementación de un protocolo de detección molecular de la infección por *Trypanosoma cruzi* en pulpa de asaí (*Euterpe precatoria*) como una técnica de control de inocuidad y calidad del producto en Bolivia. Reporte Técnico. WWF-Bolivia (World Wildlife Fund), BMZ (Federal Ministry for Economic Cooperation and Development), 16 p.

ACEAA-SWEBOL (2021). Detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de frutos lavados y no lavados de asaí (*Euterpe precatoria*). Reporte Técnico. Andes Amazon Fund (AAF), 2 p.

Avendaño-Rangel, F. A., Rey, K., Aldana, E., & Lizano, E. (2014). Primer registro de *Panstrongylus rufotuberculatus* (Hemiptera: Reduviidae) para el estado Mérida, Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental, 54(2).

da Rosa, J. A., Rocha, C. S., Gardim, S., Pinto, M. C., Mendonca, V. J., Filho, J.C., Carvalho, L., Oliveira, J., Damieli N., J., Cilense, M. & C. Almeida. (2012). Description of *Rhodnius montenegrensis* n. sp. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from the state of Rondônia, Brazil. *Zootaxa*, *3478*(1), 62-76 pp.

dos Santos S., É., Monte, G. L., Fernandes, V., & Galvão, C. (2019). *Microtriatoma trinidadensis* (Lent, 1951) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): first record in the state of Amazonas, Brazil. Volume 15, Número 5, Págs. 905-909 pp.

Durán Toledo, P. (2014). Evaluación epidemiológica del primer brote de transmisión oral de la enfermedad de Chagas en la Amazonia Boliviana (Doctoral dissertation). Universidad Mayor de San Andrés, Universitat de Barcelona.

Fundación Amigos de la Naturaleza. 2017. Manual de procesamiento de pulpa de asaí (*Euterpe precatoria*). Santa Cruz de la Sierra, Bolivia.

Páez-Rondón, O., Aldana, E., Otálora-Luna, F., & Cantillo-Barraza, O. (2019). Redescripción de las especies del género *Eratyrus Stål* (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae): nueva propuesta para la distinción interespecífica y una breve nota biogeográfica. *Revista Chilena de Entomología*, *45*(3).

Riberiro P., S., da Silva R., D., Dale, C., & Galvão, C. (2020). *Panstrongylus geniculatus* (Latreille, 1811) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): first record on Ilha Grande, Río de Janeiro, Brazil. *Check List*, *16*(2), 391-394 pp.

Vacaflores, M.R. (2021). Identificación y descripción de vectores transmisores de la enfermedad del Chagas detectados en el departamento de Pando, Bolivia. Informe de Consultoría. ACEAA-Conservación Amazónica, WWF-Bolivia, La Paz, Bolivia, 33 p.

Oficina Central ACEAA-Conservación Amazónica, La Paz, Bolivia.

Dirección: Calle 16 de Calacoto N°8230

Telf. Oficina: (+591)2-2124987

info@conservacionamazonica.org.bo

Oficina Cobija ACEAA, Pando, Bolivia

Dirección: Calle Juan Oliveira Barros s/n (a media cuadra de la calle Cataratas), Barrio La Cruz.

Tel. Cel. Oficina: (+591) 67172203

asistcobija@conservacionamazonica.org.bo

Visítanos en Facebook:
/ACEAA.Conservacion.Amazonica

Síguenos en Twitter:
@AceaaAmazonica

www.conservacionamazonica.org.bo