



**Estandarización de un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65Kda
como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis Bovina**

Aguirre Quezada, Jenniffer Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en
Biotecnología

Reyna Bello, Armando PhD.

25 de agosto de 2023

Reporte de Verificación de Contenido



Plagiarism report

documento enviado al copleaks.docx

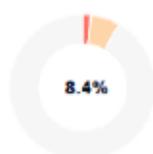
Scan details

Scan time:
August 25th, 2023 at 1:33 UTC

Total Pages:
52

Total Words:
12781

Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
● Identical	1.8%	234
● Minor Changes	0.2%	24
● Paraphrased	6.4%	816
● Omitted Words	0%	0

AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

Reyna Bello, Armando PhD.

C.C. 1758891830

Director



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: “Estandarización de un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65Kda como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina” fue realizado por la señorita Aguirre Quezada Jenniffer Alejandra; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual, me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto de 2023

Firma:

Reyna Bello, Armando PhD.

C.C. 1758891830



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo Aguirre Quezada Jennifer Alejandra, con cédula de ciudadanía n°1751036391, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "Estandarización de un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65Kda como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto de 2023

Firma:

Aguirre Quezada, Jennifer Alejandra

C.C. 1751036391



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Aguirre Quezada Jennifer Alejandra**, con cédula de ciudadanía n°1751036391, declaro autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Estandarización de un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65Kda como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 25 de agosto de 2023

Firma:

Aguirre Quezada, Jennifer Alejandra

C.C. 1751036391.

Dedicatoria

El presente trabajo de titulación está dedicado a mis padres, Ruth y Jimmy, que fueron y serán mi apoyo constante en todas las etapas de mi vida, mis maestros, mi inspiración y los amores de mi vida. Sin ustedes, nada de esto habría sido posible. A mis hermanos, Alex y Darush, mis pilares y mi motivación a seguir adelante. A mi pequeña Frost, mi compañera incondicional. A mi compañero de vida, Leo. Y a Ale quien, a pesar de todo, siempre estuvo dispuesta a empezar de cero y, a pesar del miedo, nunca se dejó amedrentar. Inspiras a todo el mundo, nunca lo olvides.

Jenniffer Alejandra Aguirre Quezada

Agradecimientos

A mi madre, Ruth, por apoyarme en todo momento, por aconsejarme y por siempre pedirme, muy amablemente, que no dejara la carrera. Gracias por todo tu esfuerzo y tu trabajo duro, quiero que sepas que todo ha valido la pena y nunca te sentirás decepcionada de mí.

A mi padre, Jimmy, por ser ese pilar en el que siempre podré apoyarme, gracias por tus palabras y sabios consejos, por siempre guiar mi camino, por tu ayuda en todos los momentos de mi vida. Gracias por inspirarme a ser una mejor persona y por motivarme en todo momento.

A mi hermano Alexis, que siempre fue una inspiración para mí, y quien me enseñó que la vida no es una carrera, que las cosas siempre pasan en el momento y lugar adecuados.

A Darush, la hermana gemela que siempre anhelé. Te agradezco de todo corazón por colmarme con ese amor incondicional que solo una hermana puede brindar. Eres y siempre serás ese motor que me impulsa a seguir adelante en la vida.

A mi pequeña Frost, por enseñarme que la vida puede ser aún más complicada de lo necesario, pero que vale la pena vivirla porque tienes a alguien que depende de ti. Gracias por acompañarme en todas mis madrugadas y brindarme calor en las noches de frío.

A mi compañero de vida, Leo, quien estuvo conmigo desde el inicio y nunca me abandonó, te agradezco profundamente por estar presente en las buenas, en las malas y en las peores. Gracias por apoyarme en cada fase de mi carrera y por nunca permitir que me rindiera. Gracias por escucharme, por los consejos, las risas, los bellos momentos, y por ser ese amigo y confidente que todos necesitan. Agradezco que la vida me haya permitido coincidir contigo.

A todas las maravillosas personas que conocí durante mi carrera, quiero expresar mi gratitud. Cada uno de ustedes me enseñó que, a pesar de las dificultades que enfrentamos, siempre podemos llevar una sonrisa en el rostro. Su compañía y apoyo han sido invaluable y han enriquecido mi vida de una manera especial. Gracias por ser parte de mi camino y por hacerlo más significativo.

Al proyecto de vinculación e investigación “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la Brucelosis y Tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)” a cargo de ARES por su financiamiento y por permitirme realizar este trabajo dentro de su línea de investigación.

Al Dr. Armando Reyna, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por haber confiado en mis capacidades desde las etapas tempranas de mi carrera. Su disponibilidad para solventar mis dudas y el valioso conocimiento que compartió conmigo han sido fundamentales en mi formación académica y personal. Especialmente, quiero agradecer toda la paciencia que demostró antes y durante el desarrollo del presente proyecto de titulación. Sin su orientación y apoyo, no habría sido posible alcanzar este logro tan significativo en mi vida.

Al Ing. Fausto Bedoya, mi gratitud por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo constante en el laboratorio.

Índice de Contenido

Carátula.....	1
Reporte de Verificación de Contenido.....	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría.....	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos	7
Índice de Contenido.....	9
Lista de Tablas	12
Lista de Figuras	13
Abreviaturas.....	14
Resumen.....	15
Abstract	16
A. Introducción	17
Formulación del Problema	17
Justificación del Problema	18
Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos	19
Hipótesis.....	19
B. Marco Teórico	20
Descripción de <i>Trypanosoma vivax</i>	20
Taxonomía	20
Nomenclatura	20
Morfología.....	21
Genoma, Transcriptoma y Evasión de la Respuesta Inmune	22
Ciclo de vida y Transmisión.....	23

Hospedadores y Distribución	24
Importancia.....	27
Aspectos Clínicos.....	30
Métodos de Diagnóstico.....	33
Diagnóstico Clínico	33
Diagnóstico Parasitológico	33
Métodos Moleculares.....	35
Métodos Serológicos o inmunológicos.....	36
ELISA (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas)	37
Antígenos en el Diagnóstico de la Tripanosomosis bovina.....	38
Proteína Recombinante “Paraflagelar65KDa”	40
C. Materiales y Métodos.....	42
Participantes.....	42
Zona de Estudio	42
Duración de la Investigación.....	42
Unidades de Estudio	42
Reactivos Específicos	43
Reactivos Requeridos	43
Equipos Requeridos.....	43
Estandarización del ELISA Indirecto.....	44
Sensibilización de la Placa.....	44
Bloqueo de la Placa.....	44
Lavados de Placa	45
Adición del Anticuerpo Primario	45
Adición del Conjugado.....	45
Adición del Sustrato.....	45
Lectura de Densidades Ópticas	46
Establecimiento del Punto de Corte	48

Cinética de Anticuerpos	48
Análisis Poblacional	48
Sensibilidad y Especificidad de la Prueba	48
Análisis Funcional	49
D. Resultados	50
Estandarización del Elisa Indirecto	50
Establecimiento del Punto de Corte	51
Cinética de Anticuerpos	52
Análisis Poblacional	52
Sensibilidad y Especificidad de la Prueba	54
E. Discusión	56
Estandarización del ELISA Indirecto y Establecimiento del Punto de Corte	56
Cinética de Anticuerpos	57
Análisis Poblacional	57
Sensibilidad y Especificidad	59
Importancia del Estudio	62
F. Conclusiones	65
G. Recomendaciones	66
H. Bibliografía	67

Lista de Tablas

Tabla 1. Tabla resumen de las variaciones en el proceso de estandarización del ELISA.....	46
Tabla 2. Mejores valores de la razón Positivos/Negativos obtenidos durante la estandarización.....	50
Tabla 3. Condiciones óptimas del ELISA indirecto estandarizado.	50
Tabla 4. Porcentaje de prevalencia de Trypanosoma vivax en las poblaciones analizadas.	53
Tabla 5. Características del ELISA estandarizado en la población de Pichincha.....	54
Tabla 6. Características del ELISA estandarizado en la población de Pedernales.	54
Tabla 7. Características del ELISA estandarizado en la población de Orellana.....	55
Tabla 8. Características del ELISA estandarizado en la población de Tena.....	55
Tabla 9. Características generales del ELISA estandarizado.	55

Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación Taxonómica de Trypanosoma (Dutonella) vivax.	21
Figura 2. Morfología de Trypanosoma vivax.	22
Figura 3. Distribución geográfica de Trypanosoma vivax.	26
Figura 4. Distribución de Trypanosoma vivax en Ecuador.	27
Figura 5. Signos clínicos evidenciados en la fase crónica de la infección por Trypanosoma vivax.	32
Figura 6. <i>Análisis por microscopía de un frotis sanguíneo procedente de un animal infectado por T. vivax.</i>	35
Figura 7. Modelo tridimensional de la proteína recombinante "Paraflagelar65KDa".	41
Figura 8. Secuencia aminoacídica de la proteína recombinante "Paraflagelar65KDa".	41
Figura 9. Esquema del proceso de estandarización del ELISA Indirecto.	47
Figura 11. Punto de corte del ELISA Indirecto estandarizado.	51
Figura 10. Cinética de anticuerpos de animales infectados experimentalmente con Trypanosoma vivax.	52
Figura 12. Análisis de poblaciones con distintos niveles de prevalencia de Trypanosoma vivax.	53

Abreviaturas

ELISA	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas.
ELISAI	Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas Indirecto.
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgM	Inmunoglobulina tipo M
KDa	Kilodalton.
M	Molar.
mM	Milimolar.
mL	Mililitro.
mg	Miligramos.
N	Normal.
OPD	Diclorhidrato de o-fenilendiamina.
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
pI	Punto Isoeléctrico.
°C	Grados Centígrados.
μL	Microlitro.
UA	Unidades de Absorbancia.

Resumen

La Tripanosomosis bovina, también conocida como Nagana en África y Cacho hueco, Huequera o Secadera en América del Sur, es una patología provocada por el hemoparásito *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* que afecta económicamente a países de América Central, Sudamérica y África subsahariana. Se manifiesta clínicamente con anemia, fiebre, pérdida de peso, desarrollo de edemas submandibulares, reducción en la producción de leche y la disminución o pérdida de la capacidad reproductiva del animal. Se identifica analizando estas manifestaciones, juntamente con técnicas parasitológicas y/o moleculares, estas últimas son altamente específicas y sensibles, pero resultan costosas y no aplicables a gran escala. Por otra parte, el diagnóstico serológico, pese a la dificultad que supone la reactividad cruzada, la purificación de antígenos y los pocos estudios relacionados a estos, es una alternativa escalable que preserva una alta especificidad y sensibilidad. La proteína recombinante Paraflagelar65KDa presenta epítomos exclusivos para *Trypanosoma vivax*, lo que minimiza la reactividad cruzada. En este contexto, el propósito del presente estudio fue estandarizar un ELISA indirecto para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma vivax* usando la proteína recombinante "Paraflagelar65KDa" como antígeno y analizar distintos sueros de animales infectados experimental y naturalmente para evidenciar la precisión de la prueba. En este ensayo, se determinó que la concentración óptima de antígeno fue 2 µg/mL, mientras que las diluciones de suero y conjugado fueron 1/200 y 1/4000, respectivamente. Con estas condiciones se estableció un punto de corte en una Densidad Óptica de 0.575 a 405 nm, permitiendo así la diferenciación entre sueros negativos y positivos durante la cinética de anticuerpos de animales infectados experimentalmente, así como en distintas poblaciones, en consecuencia, el ELISA estandarizado logró determinar la presencia de anticuerpos generados como respuesta inmunológica a la infección por *Trypanosoma vivax*.

Palabras clave: *Trypanosoma vivax*, Estandarización, ELISA indirecto, Paraflagelar65KDa.

Abstract

Bovine Trypanosomosis, also known as Nagana in Africa and as "Cacho hueco," "Huequera," or "Secadera" in South America, is a pathology caused by the hemoparasite *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax*. It economically affects countries in Central America, South America, and Sub-Saharan Africa. Clinically, it presents with anemia, fever, weight loss, submandibular edema development, reduced milk production, and diminished or lost reproductive capacity in animals. It is identified by analyzing these manifestations, along with parasitological and/or molecular techniques, with the latter being highly specific and sensitive but expensive and impractical for large-scale use. Conversely, serological diagnosis, despite challenges such as cross-reactivity, antigen purification, and limited related studies, represents a scalable alternative that maintains high specificity and sensitivity. The recombinant protein Paraflagellar65KDa offers exclusive epitopes for *Trypanosoma vivax*, minimizing cross-reactivity. In this context, the purpose of this study was to standardize an indirect ELISA for the diagnosis of bovine Trypanosomosis caused by *Trypanosoma vivax*, using the recombinant protein "Paraflagellar65KDa" as an antigen, and to analyze different sera from experimentally and naturally infected animals to demonstrate the test's accuracy. The optimal antigen concentration was determined to be 2 µg/mL, with serum and conjugate dilutions of 1/200 and 1/4000, respectively. Under these conditions, a cutoff point was established at an Optical Density of 0.575 at 405 nm, enabling differentiation between negative and positive sera during the antibody kinetics of experimentally infected animals and across different populations. Consequently, the standardized ELISA successfully determined the presence of antibodies generated as an immune response to *Trypanosoma vivax* infection.

Keywords: *Trypanosoma vivax*, Standardization, Indirect ELISA, Paraflagellar65KDa.

A. Introducción

Formulación del Problema

Trypanosoma (*Duttonella*) *vivax* es un hemoparásito flagelado perteneciente a la sección salivaria del género *Trypanosoma* que habita en el plasma sanguíneo de varios rumiantes, incluyendo el ganado bovino, provocando la enfermedad conocida como Tripanosomosis bovina, Nagana, Huequera, Secadera, Cacho Hueco o Cachera (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014).

La Tripanosomosis bovina es una enfermedad que se transmite mecánicamente por moscas hematófagas (Alves et al., 2008). Es originaria de África y fue introducida en Latinoamérica en el siglo XVI, afectando económicamente a países como Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guinea Ecuatorial, Guayana francesa, Paraguay, Perú y Venezuela (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fetene et al., 2021).

En Ecuador ya se han reportado casos de esta enfermedad en provincias como El Oro, Esmeraldas, Guayas, Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas, Pichincha, Orellana y Sucumbíos (Burgos Chávez & Ramírez Iglesias, 2021; Cáceres Sabay & Ramírez Iglesias, 2022; Hinojosa Castillo & Ramírez Iglesias, 2021; Maldonado Cardona & Ramírez Iglesias, 2022; Ortega-Montalvo et al., 2014b; Wells et al., 1977).

El animal infectado exhibe diversas manifestaciones clínicas, entre las cuales se destacan: fiebre, anemia, pérdida de peso, reducción de la producción de leche y de la capacidad reproductiva e incluso el fallecimiento del bovino (Gonzatti et al., 2014). Estas tienen un impacto directo sobre la productividad del animal y generan pérdidas económicas considerables, relacionadas con los gastos de tratamiento y la reducción de ingresos por la incapacidad de comercializar productos derivados del animal afectado (Abdala et al., 2020; Seidl et al., 1999), por lo que es indispensable tener métodos de diagnóstico que posibiliten la detección temprana de esta enfermedad para un tratamiento oportuno.

Justificación del Problema

Aunque se dispone de varios métodos de diagnóstico en el mercado, se han observado ciertas limitaciones en cuanto a su sensibilidad y especificidad, especialmente en los casos de diagnóstico clínico y parasitológico. Por ello se han adoptado métodos más robustos como las técnicas serológicas y moleculares, sin embargo, a pesar de su alta especificidad y sensibilidad, resultan costosos y, en muchos casos, inaccesibles para la mayor parte de profesionales que trabajan en el sector pecuario (Fernandes Ferreira et al., 2022).

El diagnóstico clínico se destaca por su simplicidad, sin embargo, es sumamente inespecífico debido a que las manifestaciones clínicas del animal pueden ser confundidas con otras enfermedades (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022). De la misma manera, los métodos parasitológicos exhiben disparidades en cuanto a su sensibilidad y su capacidad de detectar a *T. vivax* de forma específica durante la fase crónica de la Tripanosomosis bovina, donde la parasitemia es muy baja (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

Si bien las técnicas moleculares son altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de infecciones causadas por *Trypanosoma* sp., requieren Primers específicos que identifiquen una región única del ADN del parásito. Además, la sensibilidad de estos métodos puede verse afectada por la calidad del ADN empleado, pues el proceso de extracción influye en su integridad, comprometiendo los resultados finales (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022). Los métodos serológicos, especialmente ELISA, ofrecen un amplio abanico de antígenos que pueden usarse para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina, con una sensibilidad cercana o mayor al 95%, sin embargo, estos presentan una alta reactividad cruzada con *T. evansi*, *T. vivax*, *T. equiperdum* y *T. cruzi*, en el caso de Latinoamérica (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022), por lo que es necesario encontrar antígenos que puedan ser usados específicamente para la detección de *T. vivax*.

La proteína recombinante “Paraflagelar65KDa” de *T. vivax* posee regiones aminoacídicas, identificadas como antigénicas (epítopes), que se diferencian de las encontradas en *T. evansi* y *T. brucei*, por lo que puede ser usada como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina provocada específicamente por *Trypanosoma vivax* (Tavares Marques et al., 2013).

Por ese motivo, el presente estudio se enfoca en la estandarización de un ELISA indirecto que emplea la proteína recombinante “Praflagelar65KDa” como antígeno, con el propósito de diagnosticar la Tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma vivax*.

Objetivos

Objetivo General

Estandarizar un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65KDa como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina.

Objetivos Específicos

- Estandarizar un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65KDa como antígeno.
- Evaluar la fiabilidad del ELISA frente a sueros provenientes de infecciones experimentales.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA frente a una prueba PCR.

Hipótesis

La proteína recombinante “Paraflagelar65KDa” es antigénica y puede emplearse para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina mediante un ELISA indirecto estandarizado.

B. Marco Teórico

Descripción de *Trypanosoma vivax*

Los tripanosomas son protozoarios flagelados transmitidos cíclica y mecánicamente por vectores hematófagos afectando a mamíferos y algunas aves (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022). Estos parásitos habitan en el plasma sanguíneo, la linfa y varios tejidos de sus hospedadores (Desquesnes, 2004), siendo responsables de la enfermedad conocida como Nagana, en África (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022) y Secadera, Huequera, Cachera o Cacho hueco en América Latina (Gonzatti et al., 2014).

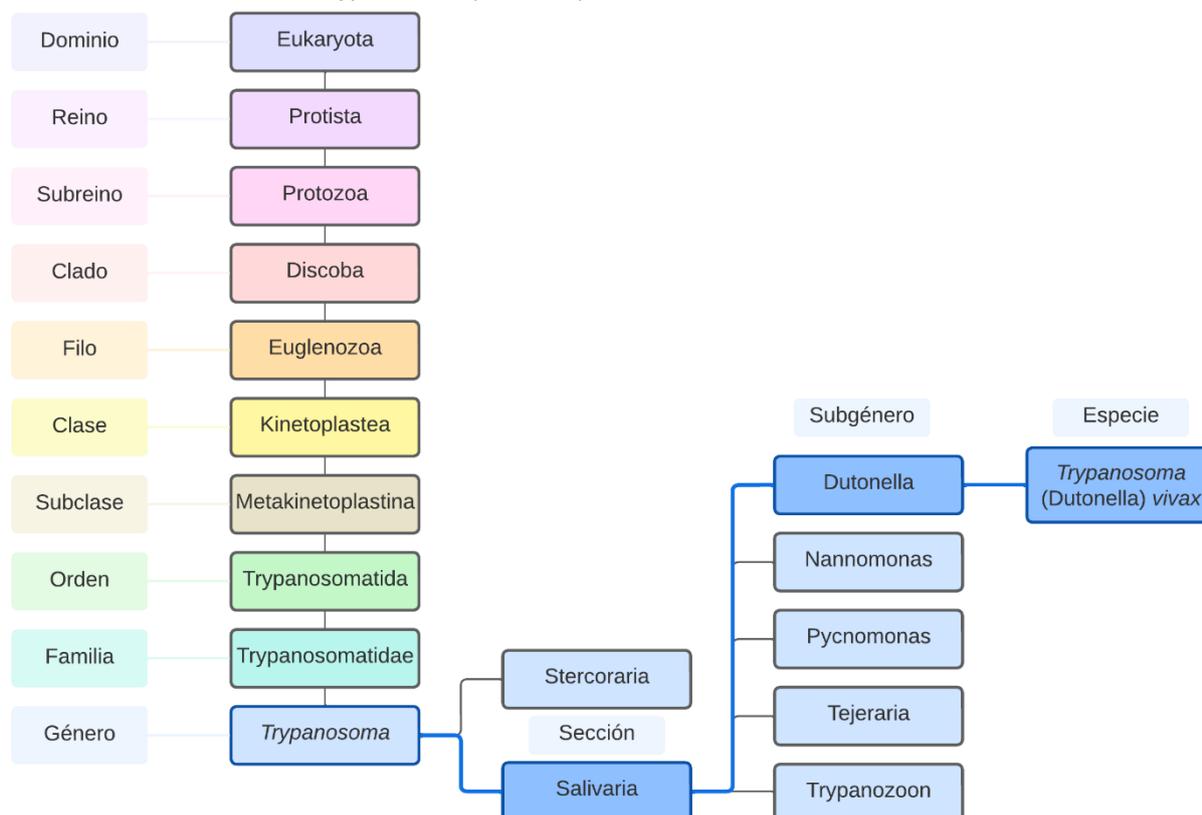
Taxonomía

Trypanosoma vivax es un hemoparásito perteneciente al género *Trypanosoma* de la familia Trypanosomatidae que posee una red de ADN extracelular denominada cinetoplasto, mismo que es característico de la clase Kinetoplastea y un flagelo propio del clado Discoba (Desquesnes, 2004; Schoch et al., 2020). Estos protozoarios presentan una división taxonómica singular, que depende de su ciclo de vida, dividiéndola en dos secciones, Stercoraria y Salivaria (Ver Figura 1). En el caso de *T. vivax*, al ser transmitido por los fómites, se encuentra entre los Salivaria, mientras que *T. cruzi* se ubica dentro de la sección Stercolaria, por transmitirse a través de las heces del triatomido (Gonzatti et al., 2014).

Nomenclatura

Trypanosoma vivax fue descrito por primera vez en África por Ziemann en el año de 1905 (Desquesnes, 2004). Años más tarde, en Guayana Francesa, Leger y Vienne (1919) descubrieron una especie del género *Trypanosoma* que causaba los mismos signos clínicos que la enfermedad africana conocida como Nagana, a la que denominaron *T. vivax* y, que luego de varias discusiones, en América tomó el nombre de *Trypanosoma (Duttonella) vivax viennei* y en África se denominó *T. vivax vivax* (Hoare, 1956).

Figura 1.
Clasificación Taxonómica de *Trypanosoma (Dutonella) vivax*.

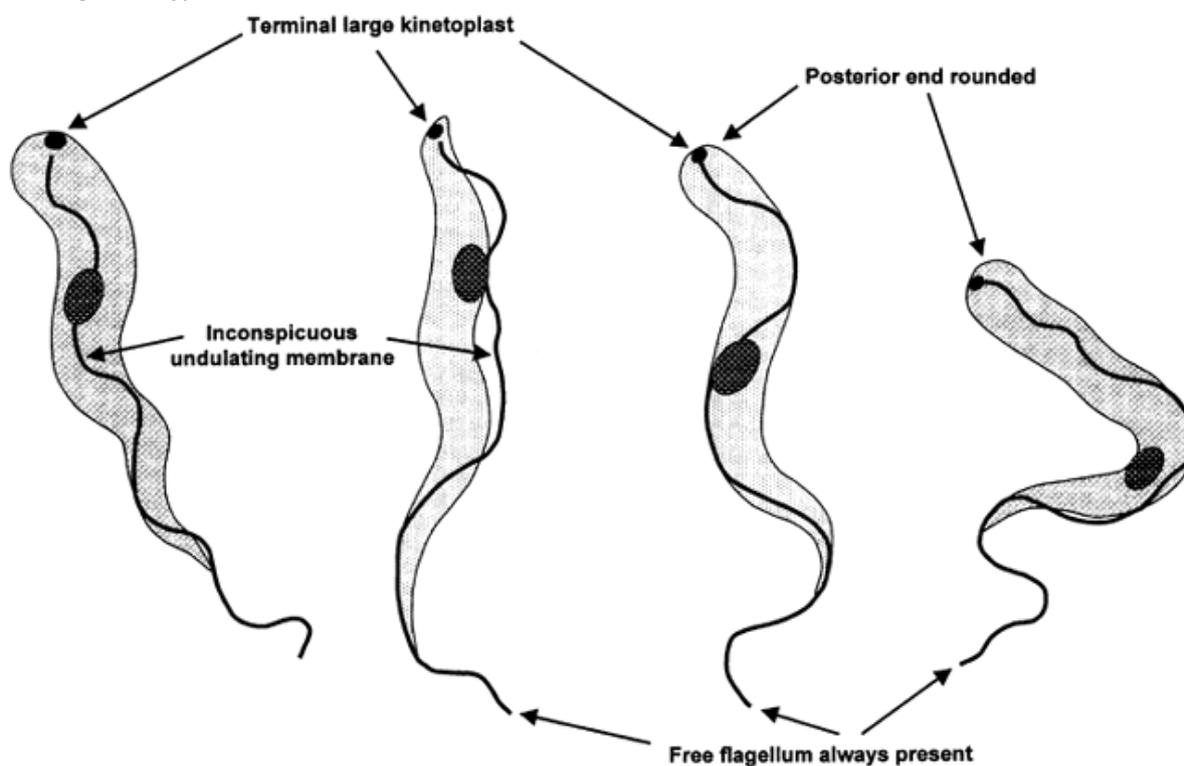


Nota. Autoría propia con base a la información encontrada en “Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America” (pp. 7) por Desquesnes, 2014, y “NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools” por Schoch et al., 2020.

Morfología

En el torrente sanguíneo, *T. vivax* se presenta como un parásito mediano y alargado de 18 – 31 μm de longitud total y 1.5 – 3 μm de ancho, posee una membrana ondulante poco desarrollada e inconspicua que une el cuerpo del parásito con su flagelo libre, cuya longitud ronda los 7 μm . Su cinetoplasto es relativamente grande pues posee un diámetro de 1 – 1.1 μm y se encuentra con frecuencia en una posición terminal, contrario a su núcleo, que suele encontrarse en la parte céntrica de *T. vivax*, con una forma alargada o redondeada, dependiendo del aislado, finalmente, el extremo posterior de este hemoparásito suele ser redondeado y ancho (Ver Figura 2). A diferencia de las cepas africanas, en América, *T. vivax* se transmite de forma mecánica, por lo que no presenta cambios morfológicos significativos durante su ciclo de vida (Alves et al., 2008; Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014; Uilenberg, 1998).

Figura 2.
Morfología de *Trypanosoma vivax*.



Nota. Tomado de "A field guide for The Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomosis" por Uilenberg, 1998.

Genoma, Transcriptoma y Evasión de la Respuesta Inmune

El cinetoplasto de *T. vivax* contiene ADN mitocondrial (K-DNA) y se ubica dentro de la matriz mitocondrial, cerca del cuerpo basal del flagelo. Se compone de dos estructuras circulares denominadas minicirulos y maxicirulos, con una longitud de 465 pb y 40 Kpb, respectivamente (Gonzatti et al., 2014).

La cepa venezolana de *T. vivax* (LIEM – 176) tiene un genoma de 41,775 Kpb con 11,870 genes codificantes y un contenido de GC (Guanina – Citocina) de 46 – 52% (Gonzatti et al., 2014), mientras que la cepa nigeriana (Y486) tiene un genoma de 24.8 Mb con 11,012 genes codificantes y un contenido de GC de 53.5% (Greif et al., 2013; The Sanger Institute, 2011; VeuPathDB Bioinformatics Resource Center, 2020).

Las diferencias más notables en el genoma de *T. vivax* en comparación con otras especies de tripanosomatidios, se encuentran en sus proteínas de superficie y los

mecanismos de evasión del sistema inmune. Las Glicoproteínas Variables de Superficie (VSG) forman una densa capa que cubre este hemoparásito proporcionándole un mecanismo de protección ante la respuesta inmune del animal infectado, bloqueando la adhesión de los anticuerpos debido a las variaciones estructurales del antígeno, que se dan de forma espontánea y continua. Así mismo, se han identificado alrededor de 79 familias de genes codifican proteínas de superficie celular en función de la presencia de un péptido señal, un anclaje GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) o una hélice transmembranal. Un rasgo que destaca en *T. vivax* es la ausencia de una Proteasa Principal de Superficie (MSP-B) del linaje n.º 46 y la presencia de 11 genes MSP-C (GP63) (Greif et al., 2013).

Ciertas proteínas de *T. vivax* son de gran interés, debido a su potencial aplicación en el inmunodiagnóstico de la Tripanosomosis bovina. Tavares (2013), en su estudio proteómico de 2D-Western Blots, menciona cinco proteínas, con un rango de peso molecular que va desde los 29 KDa a los 120 KDa, que podrían ser de interés para el diagnóstico especie-específico de este hemoparásito. Específicamente, reconoce el potencial de las proteínas Paraflagelares PFR69 y PFR73 y de las proteínas de choque térmico HSP60, HSP70 y HSP83.

Ciclo de vida y Transmisión

A diferencia de las especies africanas, *Trypanosoma vivax* presenta una transmisión no cíclica en América, donde el parásito es transmitido mecánicamente entre vertebrados sin la necesidad de desarrollar etapas evolutivas o multiplicarse dentro del vector. Esta característica permitió su proliferación en Latinoamérica, donde se transmite mecánicamente por moscas de caballos (Tabánidos) y moscas de establo (*Stomoxys* spp.), incluso se cree que los mosquitos podrían llegar a ser vectores de este hemoparásito en Venezuela y Cuba. Se presume que *T. vivax* podría tener una transmisión cíclica, sin embargo, no hay evidencia de ello. Luego de invadir el torrente circulatorio del hospedador, la multiplicación de *T. vivax* se produce en su forma de tripomastigote por división binaria en

el animal infectado En América, la multiplicación de *T. vivax* se produce en su forma de tripomastigote por división binaria en el animal infectado. (Alves et al., 2008).

La transmisión mecánica de la Tripanosomosis bovina está influenciada por la parasitemia del animal infectado y la capacidad de propagación del vector. Los Tabánidos absorben entre 1 y 12 nL de sangre infectada y la mantienen en sus probóscides hasta inocular a un segundo hospedador. Se estima que alrededor del 3% de Tabánidos alcanzan un segundo hospedador en los primeros 10 minutos, este porcentaje se reduce a 0 luego de 50 minutos. Estos datos resaltan la notable ineficiencia de la transmisión mecánica de este hemoparásito (Gonzatti et al., 2014).

Es importante destacar que *T. vivax* puede transmitirse vía transplacentaria provocando Tripanosomosis perinatal. Este fenómeno se ha manifestado en países como Venezuela y Brasil siendo de gran importancia epidemiológica, contrario a lo que sucede en África, donde no es común observar este suceso (Alves et al., 2008).

Hospedadores y Distribución

Trypanosoma vivax afecta tanto a animales domésticos como a silvestres, reportándose casos en bovinos, dromedarios, cabras, ovejas, cerdos, perros, caballos, monos, búfalos domesticados y silvestres, hipopótamos, antílopes, rinocerontes, pangolines, primates, reptiles, entre otros. Los bovinos son los animales más estudiados, en 36 países, de 198,593 animales analizados, 20,964 resultaron positivos para *T. vivax*. Se estima que la prevalencia en bovinos es de 6.4%, 3.8% en rumiantes pequeños, 3.7% en equinos, 5.5% en cerdos, 30.6% en búfalos domésticos (Venezuela), 2.6% en perros y 12.9% en animales silvestres (Fetene et al., 2021).

En el continente africano, los hemoparásitos del género *Trypanosoma* son responsables de la enfermedad conocida como Nagana. Esta se transmite de forma cíclica por moscas hematófagas del género *Glossina*, conocidas como moscas Tsétsé, cuya

distribución está específicamente restringida a ciertas partes húmedas y semihúmedas del África Subsahariana. A pesar de que *T. congolense* es el parásito más patogénico de la región, *T. vivax* es el más prevalente puesto que también puede ser transmitido mecánicamente por otros vectores como tabánidos o moscas *Stomoxys*, llegando a propagar Nagana en áreas de África libres de moscas Tsétsé como Etiopía. Gracias a este mecanismo, *T. vivax* fue capaz de invadir América Central, Sudamérica e Irán (Ver Figura 3) (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fetene et al., 2021).

Fuera de África, *T. vivax* está presente en América central y del sur, específicamente en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guinea Ecuatorial, Guayana francesa, Paraguay, Perú y Venezuela (Ver Figura 3). Hasta la fecha no se han presentado casos en América del norte, Australia, Asia y regiones del Pacífico (Fetene et al., 2021).

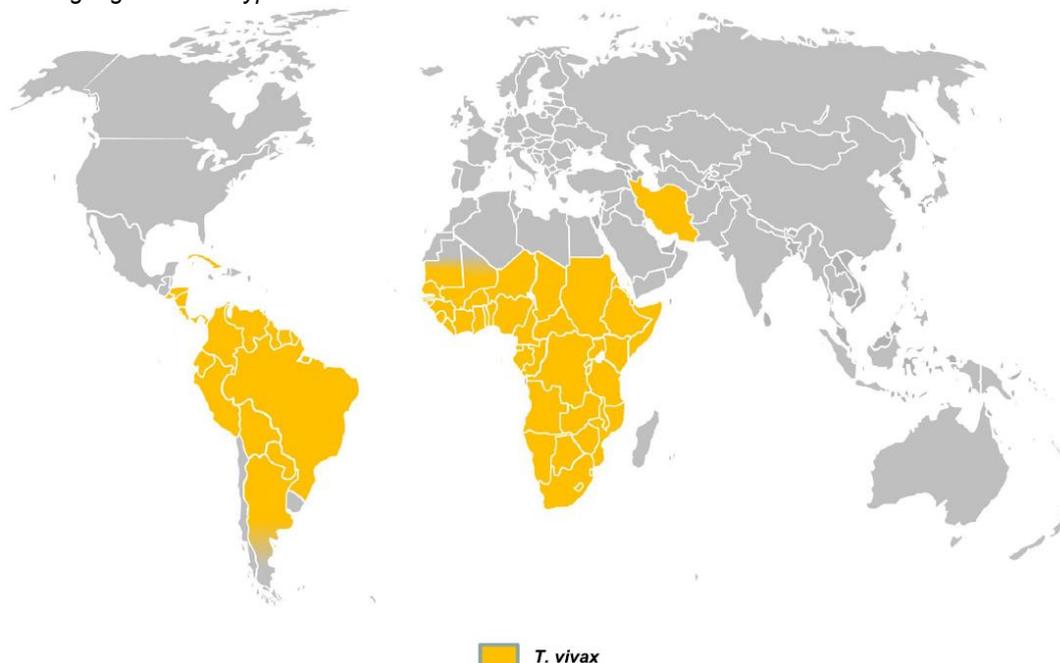
Se cree que la introducción de *T. vivax* en Latinoamérica tuvo lugar en el siglo XVI a través de caballos y ganado infectado (Fetene et al., 2021). Se ha aceptado la idea de que, en el año 1830, en las comunidades francesas, este hemoparásito fue introducido a través de ganado Cebú proveniente de Senegal. Esto resultó en el primer reporte documentado Guayana Francesa en 1905 por Ziemann (Hoare, 1956).

El primer reporte de *T. vivax* en Ecuador, fue realizado por Wells et al., (1977), donde analizaron 310 sueros bovinos, obteniendo una prevalencia del 22.5% utilizando Inmuno-fluorescencia-indirecta. Por otro lado, y más recientemente, se realizó la primera caracterización molecular de este hemoparásito tierra ecuatoriana en el trabajo realizado por Chávez-Larrea et al. (2021), donde se estudió un brote de Tripanosomosis bovina en la provincia de Manabí encontrando que, de 20 animales, 3 resultaron positivos para esta enfermedad al ser analizados por TviCarL-PCR. Además de ello, un análisis del árbol filogenético de este aislado ecuatorianos mostró una estrecha relación con aislados de América del Sur y África Occidental.

En estudios posteriores se ha reportado la presencia de *T. vivax* en distintas provincias del país (Ver Figura 4). En el trabajo de Cáceres Sabay y Ramírez Iglesias (2022), se reportó la seroprevalencia de *Trypanosoma* spp. en bovinos mediante ELISAI en seis provincias de la costa ecuatoriana: Esmeraldas (32.43%), Manabí (16.83%), Los Ríos (6.12%), Guayas (14.47%), Santa Elena (12.12%) y El Oro (17.65%).

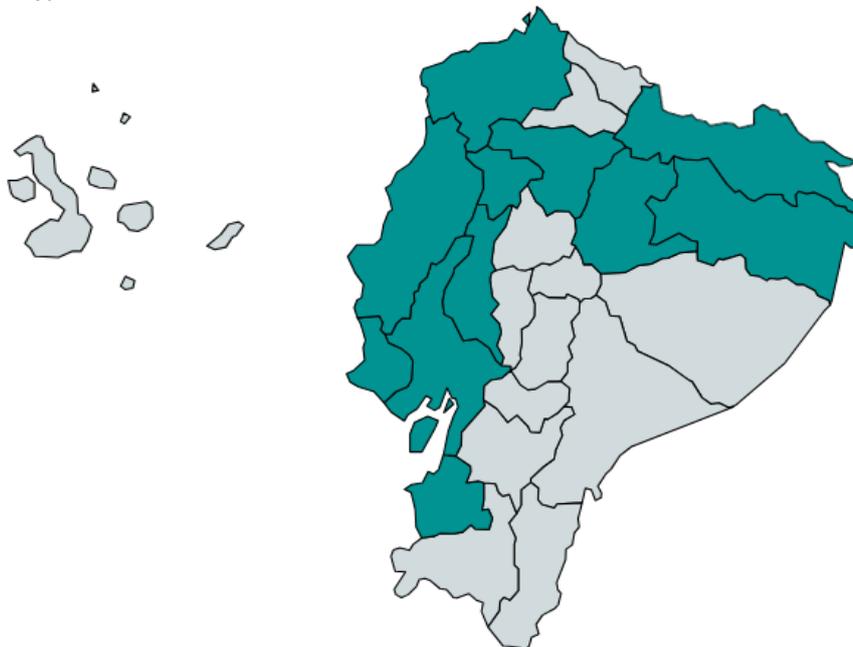
Con la misma tendencia, Burgos Chávez y Ramírez Iglesias (2021) establecieron la prevalencia de *Trypanosoma* spp. en distintas parroquias de Santo Domingo de los Tsáchilas y Ortega-Montalvo et al., (2014b, 2014a) analizaron molecularmente a 152 bovinos procedentes de Santo Domingo de los Tsáchilas y de Esmeraldas, dentro de un centro de faenamiento en la ciudad de Quito, obteniendo una prevalencia de 30.26% mediante PCR y 1.97% usando la Técnica de Woo. Por otro lado, tanto Hinojosa Castillo (2021) y Maldonado Cardona (2022), bajo la tutela de Ramírez Iglesias, determinaron la seroprevalencia de Tripanosomosis bovina mediante ELISAI/*T. evansi* en la región amazónica del Ecuador, específicamente en las provincias de Napo (6.82% - 34.85%), Orellana (8.43 - 22.22 %) y Sucumbíos (24.44% - 40.79%).

Figura 3.
Distribución geográfica de *Trypanosoma vivax*.



Nota. Adaptado de "A review on the diagnosis of animal trypanosomoses" (pp. 4) por Desquesnes et al., 2022.

Figura 4.
Distribución de *Trypanosoma vivax* en Ecuador.



Nota. Autoría propia con base a la información tomada de “Seroprevalencia de Tripanosomosis Animal en la Región Costa del Ecuador” (pp.18) por Cáceres Sabay y Ramírez Iglesias, 2022; “Seroprevalencia de Tripanosomosis Bovina en la Región Amazónica del Ecuador” (pp. 22) por Maldonado Cardona y Ramírez Iglesias, 2022; “Determinación de la Seroprevalencia de Tripanosomosis Bovina Causada por *Trypanosoma* spp. en Tres Provincias del Oriente Ecuatoriano (Napo, Orellana, Sucumbíos)” (pp. 16) por Hinojosa Castillo y Ramírez Iglesias, 2021; “Determinación de la Seroprevalencia de la Tripanosomosis Causada por *Trypanosoma* spp. en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas” (pp. 17) por Burgos Chávez y Ramírez Iglesias, 2021; “Primer Reporte e Identificación Molecular de *Trypanosoma vivax* en Bovinos del Ecuador” (pp. 2) por Ortega-Montalvo et al., 2014; “First Report and Molecular Identification of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* outbreak in cattle population from Ecuador” por Chávez-Larrea et al., 2021.

Importancia

La disminución de la producción de leche y la actividad reproductiva, junto con la pérdida de peso y la muerte del animal, son manifestaciones características de la Tripanosomosis bovina que tienen un gran impacto económico en el sector pecuario (Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014).

En África, esta enfermedad afecta a mamíferos domésticos y silvestres, en especial al ganado, donde se presentan alrededor de 3 millones de muertes cada año, a pesar del uso de medicamentos tripanocidas (35 millones de dosis anuales), provocando pérdidas económicas entre US\$ 1.0 – 1.2 billones (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022).

En América Latina, no se ha analizado a profundidad el impacto económico de la Tripanosomosis bovina en la actualidad, pero se ha reportado estudios en lugares como el Pantanal en Brasil y en las zonas bolivianas aledañas a esta región en 1995, donde se estiman pérdidas de US\$32,631 considerando factores como mortalidad, abortos, pérdida de productividad y tratamiento de los bovinos afectados por la Tripanosomosis bovina (Seidl et al., 1999). En Brasil, el costo de tratamiento con clorhidrato de isometamidium ronda los US\$ 37.80 anualmente por animal (Alves et al., 2008), sumado a la reducción en la producción de leche (27%) y la disminución del número de preñez (45%) se presentan pérdidas considerables a causa de esta enfermedad (Gonzatti et al., 2014).

En Guayana Francesa, a causa de un brote de Tripanosomosis bovina en 1992, se estiman pérdidas equivalentes al 3.3% en peso vivo del animal, perdiendo aproximadamente 30.5€ por pérdida de peso y 3€ durante el tratamiento (Desquesnes, 2004). En Argentina se analizaron las consecuencias económicas derivadas de un brote de Tripanosomosis bovina en 2020, donde se estimó una suma total de US\$ 58,802.4 considerando factores como el descarte del animal, el tratamiento clínico (9.20%), abortos y muerte (Abdala et al., 2020).

En Colombia se cree que existe un gran impacto económico derivado de la Tripanosomosis bovina, sin embargo, es difícil de extrapolar debido a que no se ha logrado estimar la frecuencia con la que los episodios clínicos aparecen en diferentes zonas del país (E. Otte & Lobo, 1984). Indistintamente, se recomienda revisar la incidencia desde la perspectiva del episodio clínico y desde el hato infectado asintomático (Abuabara Pérez & Otte, 1989).

Desde la primera perspectiva, se consideran factores como el descarte forzoso del ganado, reducción de la producción en leche, gastos en medicamento y servicio veterinario e incidencia de abortos o nacimientos de terneros muertos, teniendo así una pérdida de US\$ 5,654 en 1978, mientras que, en 1988, un brote de la enfermedad en Cali, representó

una pérdida de US\$ 726.01 solamente en medicación, monto que no pudo ser recuperado debido a la reducción permanente de producción de leche en las vacas afectadas (Abuabara Pérez & Otte, 1989; M. J. Otte, 1991). Por otro lado, desde la perspectiva del animal asintomático, se tiene que algunos terneros con parasitemia y que no presentaban signos clínicos tendían a ganar peso en una menor proporción que los animales sanos, además de no observar una recuperación del peso “perdido” en fechas posteriores (Abuabara Pérez & Otte, 1989; M. J. Otte, 1991).

En Ecuador, según el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) (2023a), en 2022 se registraron 3.9 millones de cabezas de ganado bovino distribuido en las tres regiones del país: Costa 38.5%, Sierra 53.0% y Amazonía 8.5%, con una producción de leche de 16.3%, 79.5% y 4.2% respectivamente. Específicamente, en la región Sierra, cada vaca produce alrededor de 8.0 litros de leche al día, mientras que en la Amazonía se producen 5.3 litros de leche por vaca y en la región Costa 4.0 litros/vaca.

Según la Corporación Financiera Nacional B.P. (2023), hasta febrero de 2023 el precio del litro de leche se mantuvo en US\$ 0.41, considerando la producción y la distribución del ganado bovino en las provincias del Ecuador, se estima que las ganancias por venta de leche en la Costa son US\$ 2.4 millones, en la Sierra US\$ 6.7 y en la Amazonía US\$ 0.7 millones. La Tripanosomosis bovina podría causar grandes pérdidas económicas en este sector y durante el faenamiento de los animales al propagarse por las distintas provincias del Ecuador.

En la provincia de Esmeraldas, hasta 2022 se registraron 251,000 cabezas de ganado (INEC, 2023b) y según el estudio realizado por Cáceres Sabay y Ramirez Iglesias (2022), la seroprevalencia promedio de Tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma sp.* es de 32.43%, por lo que se cree que alrededor de 81,399 bovinos estarían en riesgo de sufrir esta enfermedad.

De la misma manera, en Manabí, con un porcentaje promedio de 16.83% (Cáceres Sabay & Ramírez Iglesias, 2022) y una población de 805,455 (INEC, 2023b), aproximadamente 135,558 animales se encuentran en riesgo. En la provincia del Guayas, se registraron 222,624 cabezas de ganado bovino (INEC, 2023b) y una seroprevalencia promedio de 14.47% (Cáceres Sabay & Ramírez Iglesias, 2022), teniendo así, un estimado de 32,213 animales en potencial riesgo de contraer Tripanosomosis bovina.

Finalmente, en la provincia del Oro, se cree que, aproximadamente 24,754 cabezas de ganado se encuentran en riesgo, considerando que existe una población de 140,254 animales (INEC, 2023b) y una seroprevalencia promedio de 17.65% (Cáceres Sabay & Ramírez Iglesias, 2022).

Aspectos Clínicos

La Tripanosomosis es una enfermedad que afecta tanto a mamíferos como a algunas aves. El término "Tripanosomosis" se deriva de la combinación del agente causal de la enfermedad, *Trypanosoma* sp., representado por "Tripanosom-", y el sufijo "-osis", usado frecuentemente para hacer referencia a las enfermedades. Para hablar de la Tripanosomosis bovina, hay que tomar en cuenta dos aspectos: la infección por *Trypanosoma* sp., que puede ser previa o actual, y la enfermedad asociada a *Trypanosoma* sp., lo que implica una infección activa y la presencia de signos clínicos (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022).

Los animales no infectados son aquellos que no han tenido contacto alguno con hemoparásitos del género *Trypanosoma*. En estos casos no se observan parásitos circulantes, ni anticuerpos específicos, ni manifestaciones clínicas en el animal. Esto puede verificarse mediante la detección de Inmunoglobulinas tipo G (IgG) usando antígenos solubles derivados del lisado de células enteras en un ELISA. Por otro lado, en una infección activa, los niveles de parasitemia oscilan entre valores altos y bajos, lo cual puede

identificarse mediante técnicas parasitológicas y moleculares, así mismo, el animal presenta signos reconocibles, mismos que serán abordados más adelante. Finalmente, las infecciones causadas por *Trypanosoma* sp. pueden presentarse de dos formas: sintomáticas y asintomáticas, esta última puede dificultar el diagnóstico debido a la ausencia de signos clínicos, además, los métodos serológicos empleados para analizar a los animales pueden generar cierta ambigüedad al determinar si se trata de una infección previa o presente (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022).

En América Latina, la Tripanosomosis bovina generalmente se presenta de forma crónica en el ganado (Gonzatti et al., 2014), donde *Bos taurus* es más susceptible a la enfermedad que *Bos indicus*, a diferencia de África, donde algunos ejemplares de *Bos taurus* son tripanotolerantes. A pesar de ello, en Latinoamérica no se han reportado casos del “síndrome hemorrágico” característico de las infecciones en el Este de África, de la misma manera, no existen reportes de la formación del “chancro de inoculación” propio de las infecciones africanas transmitidas por *Glossina* (Desquesnes, 2004).

Existen tres fases a lo largo de esta enfermedad, iniciando por la fase prepatente, que inicia cuando el vector inocular al parásito en el hospedador y termina al detectar los parásitos en la sangre de este; suele tener una duración de 2 a 10 días en los que no se manifiesta ningún signo (Gonzatti et al., 2014).

La fase aguda de la infección inicia después de la aparición de los parásitos en la sangre del animal y puede extenderse hasta tres meses en los que el bovino manifiesta signos clínicos como fiebre acompañada de una anemia progresiva como resultado de una hemólisis extravascular junto con una disminución de la eritropoyesis y procesos hemorrágicos relacionados con trombocitopenia y disminución de factores de coagulación (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

Otros síntomas incluyen la pérdida de peso, emaciación, lagrimeo, el desarrollo de edemas sublinguales y submandibulares, descargas nasales, inflamación de los ganglios linfáticos preescapulares y prefemorales y reducción en la producción de leche y carne (Ver Figura 5) (Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014). Estos vienen acompañados de una interrupción en la actividad reproductiva del animal debido a la inhibición de la espermatogénesis acompañada de una degeneración testicular y epididimal en el caso de los machos y el aumento de abortos, lesiones genitales y la desregularización del ciclo estral en las hembras (Gonzatti et al., 2014).

Finalmente, la fase crónica tiene lugar de dos a tres meses después de la infección. Aquí los animales afectados logran recuperar sus parámetros sanguíneos normales luego de haber sobrevivido a la infección. Sin embargo, si el animal es sometido a algún tipo de estrés, existe la posibilidad de que la parasitemia reaparezca, dando inicio nuevamente a la sintomatología característica de la fase aguda (Gonzatti et al., 2014).

Figura 5.
Signos clínicos evidenciados en la fase crónica de la infección por *Trypanosoma vivax*.



Nota. Adaptado de “*Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco” por MI Gonzatti et al., 2014, en S. Magez & M. Radwanska (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 273). Springer.

Métodos de Diagnóstico

Diagnóstico Clínico

Durante el diagnóstico clínico se examina la sintomatología característica de la fase crónica de la Tripanosomosis bovina junto con pruebas bioquímicas y un análisis hematológico (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022). Los signos clínicos pueden estar acompañados de trastornos neurológicos como agresividad, bruxismo, opistótonos y falta de coordinación motora; estos son provocados por la presencia de *T. vivax* en el tejido nervioso y el fluido cerebroespinal del animal, lo que también puede causar degeneración de tejidos, inflamación y reacciones autoinmunes (Fernandes Ferreira et al., 2022).

El análisis hematológico revela signos como la aparición de anemia normocítica normocrómica, leucocitosis, neutrofilia y trombocitopenia. Por otro lado, el análisis bioquímico denota variaciones como la disminución de la glicemia, triglicéridos y colesterol, además del aumento de los niveles de fosfatasa alcalina, urea, creatinina, AST (Aspartato Aminotransferasa) y ALT (Alanina Transaminasa) (Fernandes Ferreira et al., 2022).

Si bien el diagnóstico clínico es sencillo y rápido, no es muy específico, puesto que los signos presentados por el animal pueden confundirse con otras enfermedades como la leptospirosis bovina, leucosis bovina, neosporosis bovina e infecciones virales coexistentes. Por ello es fundamental complementar este tipo de diagnóstico con técnicas serológicas o moleculares (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

Diagnóstico Parasitológico

Es conocido como el Gold Standard para el diagnóstico de infecciones por *T. vivax* (Fernandes Ferreira et al., 2022) y se emplea como método principal para la detección de una infección activa en el animal, a pesar de ello, durante las primeras 3 semanas de

infección, cualquier muestra analizada puede generar falsos negativos debido a la baja parasitemia (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022).

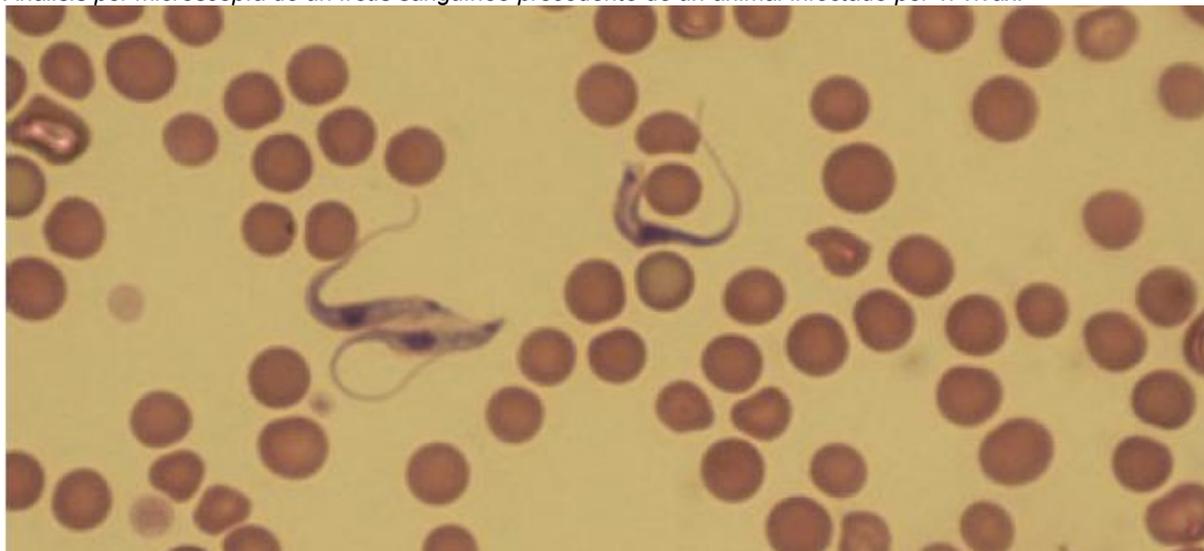
El análisis por microscopía óptica de un frotis sanguíneo fresco o de un frotis teñido con Giemsa es el más sencillo y económico, pero tiene muy baja sensibilidad en comparación con el resto de las técnicas (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022), aquí se observa directamente la morfología del parásito, específicamente identifica la presencia del flagelo, núcleo y cinetoplasto (Ver Figura 6) (Gonzatti et al., 2014).

Otra técnica ampliamente reconocida es la Centrifugación de Hematocrito (HCT) o Técnica de Woo que permite la detección del parásito de seis a diez días post infección de forma fácil y a gran escala (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Woo, 1969), pero es poco específica, incluso llegando a ser poco sensible (50%) cuando la parasitemia en sangre se encuentra entre 60-300 parásitos/mL (Fernandes Ferreira et al., 2022).

Finalmente, el Método de Murray o el Método de Capa Leucocítica (BCM), es el más sensible de todos y se deriva del HCT, aquí el tubo capilar es cortado antes de ingresar a la centrífuga para extruir la capa leucocitaria en un portaobjetos para examinarse por microscopía. Esta técnica tiene una baja repetibilidad y reproducibilidad debido a las variaciones en el manejo por los técnicos de laboratorio y la delicadeza que requiere el proceso de extrusión y goteo de la capa leucocitaria en el portaobjetos (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022).

Figura 6.

Análisis por microscopía de un frotis sanguíneo procedente de un animal infectado por T. vivax.



Nota. Adaptado de "Trypanosoma (Duttonella) vivax and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco" por MI Gonzatti et al., 2014, en S. Magez & M. Radwanska (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 264). Springer.

Métodos Moleculares

Estos métodos son capaces de identificar a los parásitos involucrados en una infección activa, pues se enfocan en la detección de su ADN durante la fase crónica de la enfermedad, durante la cual, la parasitemia es muy baja al igual que la generación de anticuerpos por parte del animal infectado (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022).

Se usan técnicas basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction) como LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), qPCR (Quantitative PCR), PCR anidada o PCR-ELISA que, a pesar de ser altamente sensibles y específicas, pueden ser alteradas por factores como la calidad de la muestra, el método de extracción de ADN, el tipo de hospedador y los Primers empleados (Fernandes Ferreira et al., 2022). Además, se encuentran limitados por la parasitemia de las muestras, el tiempo que transcurre entre la obtención de una muestra y la revelación de los resultados, acceso a el equipamiento y las capacidades de los técnicos de laboratorio (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022).

Entre las técnicas mencionadas, la PCR cuantitativa (qPCR) se destaca debido a su alta especificidad, sensibilidad, reproducibilidad, a su bajo riesgo de contaminación y a la

capacidad que tiene para detectar la infección por *T. vivax* durante la fase prepatente, donde el diagnóstico parasitológico, inmunológico y clínico se ven afectados (Fernandes Ferreira et al., 2022).

Métodos Serológicos o inmunológicos

El diagnóstico serológico de *Trypanosoma vivax* inicia en 1976 con un IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test o Ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta) realizado por Platt y Adams (Fernandes Ferreira et al., 2022) luego de esto se propuso el uso de Western Blot, Ensayos Inmunocromatográficos y ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas). Este último, junto con el IFAT, es el método serológico más usado debido a su alta sensibilidad y a la posibilidad de establecer la distribución e infecciones previas por este hemoparásito, sin embargo, es necesario considerar que la especificidad puede reducirse debido a una posible reactividad cruzada con otras infecciones bovinas, especialmente cuando se emplean extractos crudos de *T. vivax* (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

IFAT tiene una buena sensibilidad y no tiene reacciones cruzadas con *Anaplasma marginale*, *Babesia sp.* y *Theileria theileri*, sin embargo, está condicionado por la interpretación subjetiva, la disponibilidad de un microscopio sofisticado, el engorroso proceso de obtención de antígenos y las reacciones cruzadas que presenta con *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* y *T. evansi*. Esta técnica suele usarse para realizar análisis individuales como una alternativa al ELISA, pero normalmente no es aplicable en estudios a gran escala (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

La técnica de Western Blot se basa en la separación de las proteínas del parásito mediante electroforesis, seguido por su transferencia hacia una membrana de nitrocelulosa para detectar a los anticuerpos que reaccionan con distintos antígenos del parásito. Si bien es una técnica formidable, consume mucho tiempo y recursos, por lo que se ha limitado al

área de la investigación o se emplea en centros de referencia para el diagnóstico (Fernandes Ferreira et al., 2022).

En los ensayos inmunocromatográficos, las proteínas recombinantes toman relevancia, pues su implementación en estas pruebas aumenta su sensibilidad, convirtiéndose en un método atractivo para el diagnóstico fácil y rápido de la Tripanosomosis Bovina. Este método usa una repetición en tándem de antígenos conservados de *T. congolense*, *T. brucei* y *T. vivax*, siendo efectivo para el diagnóstico de la enfermedad, pero no para la detección específica del hemoparásito causante (Fernandes Ferreira et al., 2022).

La aglutinación es una técnica sencilla usada para el diagnóstico de la Tripanosomosis, específicamente, CATT es una prueba diseñada para la detección de *T. evansi*, pero presenta reactividad cruzada con *T. vivax*, por lo que suele usarse para su identificación. Esta técnica emplea un antígeno de *T. evansi* producido en ratas (RoTat 1.2), fijado en una tarjeta plástica de color blanco que detecta la presencia de inmunoglobulinas tipo M (IgM), indicando una infección reciente (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022).

ELISA (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas)

El Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) se usó por primera vez en 1977 por Luckins para la detección de anticuerpos en ganado infectado por especies del género *Trypanosoma* (Luckins, 1977). A partir de ese momento, se han propuesto varios protocolos para la detección de anticuerpos anti *T. vivax* usando un amplio abanico de antígenos, mismos que pueden ser crudos, purificados o proteínas recombinantes, con una sensibilidad y especificidad de 97.6% y 96.9%, respectivamente en el caso de antígenos crudos (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

El ELISA indirecto se presenta como una alternativa simple, efectiva y aplicable a gran escala, que permite cuantificar la presencia de anticuerpos tanto en la fase aguda

como en la fase crónica de la enfermedad (Gonzatti et al., 2014), permitiendo, además, corroborar el estado de “no infectado” en un animal (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022).

Esta técnica presenta dificultades al momento de confirmar una infección activa en el hospedador debido a la naturaleza del sistema inmune, pues la Inmunoglobulina IgG permanece en el sujeto 2 – 4 meses después de sanar, ya sea por cuenta propia o mediante un tratamiento. Así mismo, cabe la posibilidad de obtener resultados falsos negativos cuando la infección tiene un foco extravascular. En estas circunstancias, el parásito no entra en contacto con el sistema inmune y, en consecuencia, este no genera anticuerpos (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022).

Aunque un ELISA que emplea antígenos crudos se presenta como una mejor alternativa al uso de técnicas parasitológicas y moleculares (PCR), por su alta sensibilidad y especificidad (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022), dependiendo del antígeno usado, esta no permite discriminar entre infecciones causadas por *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. cruzi* o *T. evansi* (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022) y suele presentar reactividad cruzada con *Leishmania*, *Theileria* sp, *Babesia divergens* o *Anaplasma marginale*, además, la reproductibilidad de la prueba queda comprometida debido a las variaciones derivadas de los ensayos “en casa”, lo que suele corregirse al emplear kits comerciales, donde el protocolo está estandarizado y los antígenos usados son producidos bajo condiciones específicas (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

Antígenos en el Diagnóstico de la Tripanosomosis bovina

Gracias a los avances en la biología molecular y de la ingeniería genética, se han desarrollado antígenos recombinantes basados en una única molécula con una diversidad de epítomos ilimitada, que permite detectar de forma específica anticuerpos generados contra una especie de *Trypanosoma*, en este caso, *T. vivax* (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

Se han usado distintas proteínas recombinantes como antígenos para la detección de anticuerpos anti *T. vivax* mediante ELISA indirecto, como el estudio de Pillay y su equipo de trabajo (2013), donde propusieron el uso de la proteína GM6, una proteína asociada al flagelo de *T. vivax*, para el inmunodiagnóstico de la enfermedad causada por este hemoparásito.

En África se usó la proteína recombinante TeGM6-4r que contiene 4 dominios repetidos de la proteína GM6 de *T. evansi*, para la detección de *T. vivax* en el ganado bovino, ovino y caprino con un rango de sensibilidad de 73.0 – 79.4% y especificidad de 87.5 – 89.9% (Nguyen et al., 2015).

En 2016, Uzcanga et al., usaron una glicoproteína de superficie de 64KDa procedente de *T. equiperdum*, denominado p64 para la detección de anticuerpos anti *T. vivax*. La seroconversión de animales infectados experimentalmente con *T. vivax* con una sensibilidad de 71.6% y una especificidad de 98.8%, puso en evidencia la capacidad antigénica de p64. Debido a que esta glicoproteína es propia de *T. equiperdum*, se espera una reactividad cruzada con este parásito (Camargo et al., 2015; Uzcanga et al., 2016).

Eyssen et al., (2018) usaron el dominio catalítico de la catepsina tipo L cisteína proteasa de *T. vivax* (rTviCATLcat), discriminando correctamente entre sueros de bovinos sanos e infectados con una sensibilidad de 71.9% y especificidad de 86.0%.

Gomide Pinheiro et al., (2021), usaron una proteína altamente conservada en tripanosomatídios, la proteína recombinante MyxoTLm de *Leishmania mexicana*, para la detección de *T. vivax* en ganado bovino, discriminando correctamente entre animales sanos e infectados, con valores altos de sensibilidad, especificidad y exactitud en comparación con los resultados obtenidos a partir de un antígeno crudo de *T. evansi*. Cabe destacar que esta proteína recombinante tiene un porcentaje de similitud de 69% con su homóloga en *T. vivax*, 71% con *T. evansi*, 71% con *T. brucei*, y 72% con *T. congolense* (Gomide Pinheiro et al.,

2021), por lo que se presume la posibilidad de una reactividad cruzada con estas especies durante el diagnóstico.

Proteína Recombinante “Paraflagelar65KDa”

Trypanosoma vivax, al igual que varios tripanosomatídeos, contienen un cuerpo fibroso denominado varilla paraflagelar (Paraflagellar Rod - PFR), constituido de filamentos discretos repartidos a lo largo del flagelo y unido al axonema flagelar, esta se encuentra en todos los estadios del parásito y se asocia a las funciones de movimiento y adherencia al hospedador (Maga & LeBowitz, n.d.; Michailowsky et al., 2003).

Tavares Marques (2013) realizó un estudio proteómico en Western Blot 2D, donde identifica 12 proteínas de *T. vivax* con potencial antigénico, de las cuales, cinco podrían ser aplicables para el diagnóstico especie-específico de la Tripanosomosis bovina. De las cinco proteínas, dos son Paraflagelares (PFR1 y PFR2) y tres son de choque térmico (HSP60, HSP70 y HSP83.). La que causa mayor interés es la proteína Paraflagelar PFR1, cuyo modelo tridimensional se observa en la Figura 7. Esta tiene un peso molecular de 69.66 KDa, un punto isoeléctrico (pI) de 5.84, carece de regiones transmembranales y posee regiones antigénicas en: 347-385, 448-475 y 478-502 (Ver Figura 8).

La proteína recombinante “Paraflagelar65KDa” se inspira en la estructura de la proteína PFR1 de *T. vivax* debido a que las secuencias aminoacídicas de sus regiones antigénicas son diferentes a las de *T. evansi* y *T. brucei*, además, en la zona céntrica de la proteína existen regiones con aminoácidos variables que fueron considerados antigénicos según el programa bioinformático Antheprot (Tavares Marques et al., 2013).

García (2005), realizó un estudio donde se señala que una proteína inmunodominante de 65 KDa fue reconocida por los anticuerpos de un ovino infectado experimentalmente con *T. vivax* y se presume que se trata de la PFR1, por lo cual se

sugiere evaluar el potencial antigénico de la proteína y su posible uso como herramienta de diagnóstico de la Tripanosomosis bovina provocada por *T. vivax*.

Figura 7.

Modelo tridimensional de la proteína recombinante "Paraflagelar65KDa".



Nota. Adaptado de "Estudio de las proteínas inmunogénicas de *Trypanosoma vivax*" por Tavares Marques et al., 2013, (pp. 121).

Figura 8.

Secuencia aminoacídica de la proteína recombinante "Paraflagelar65KDa".

>TVMIRANOV_C30

```

1  MSAKEVGTVPADQQQPAVPEVTDITLEAARKQKIHNLKLKTACLSNEEYVQDLHVSTWS
61  ETQRQKLQTAHEKAHELLAAVEGGTKWSLTEAYDIRKLMRVCGLELSVRELYKPEDKPOF
121 MEIVALKKTLELQHHNKTRTVSETGTIDNAIAKLEKIEDELRRSQLDASEMAQVPVAM
181 LKNVEDCMNVTVVQTALLGNEEQIKLQLEAIKKASDIRNVAIADGEMAIABEQYYIKAQL
241 LEHLVELVADKFRIIGQTEENKQFSKIHEVQKKSFOEAAAIKDAKRRLKQRCEDDLKSL
301 HDTIQKADLEDAEAMKRFSQKEKSERFIHENLDKQDEAWRRIQELERVLQRLGTERFEE
361 VKRRIEENDREKRVVEYQQLDVCQGHKLLLELSVYNCDLALRCMGMLEEIMAEGCSAI
421 KSRHDKTCEELASLSLQVHQEYLEAFRRLYKTLGQLVYKKEKRLEEIDRNIRTHIQLEF
481 AIETF DENAKQHS DRKKELYKLRAQVEEELEMLKDKMAQALEMF GPTEDALNQA GIEFVH
541 PAEEVEDGNMNRSSKMVEYRAHLAKQEEVKIAAEREELKRSKMLQSQQHRGRTVQQIT

```

Nota. En negritas y con una línea negra sobrepuesta, se observan las regiones antigénicas de la proteína. Adaptado de "Estudio de las proteínas inmunogénicas de *Trypanosoma vivax*" por Tavares Marques et al., 2013, (pp. 121).

C. Materiales y Métodos

Participantes

El presente trabajo de titulación fue elaborado por la señorita Jenniffer Alejandra Aguirre Quezada, estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la tutoría de Armando Reyna Bello PhD., Docente – Investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas y con el apoyo del Ing. Fausto Bedoya, Técnico – Docente del Laboratorio de Biología Molecular de la misma institución.

Zona de Estudio

El presente trabajo de titulación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas, ubicado en el Kilómetro 24 de la Vía Santo Domingo – Quevedo, en la Hacienda Zoila Luz (Latitud 0°24'45.2" S y Longitud 79°18'34.1" O).

Duración de la Investigación

El presente trabajo de titulación se realizó en el periodo comprendido entre los meses de enero y agosto del año 2023.

Unidades de Estudio

A lo largo del presente trabajo de titulación se emplearon 421 sueros de bovinos. Durante la estandarización y la elaboración de la cinética de anticuerpos, se emplearon 34 sueros de bovinos macho de la raza *Bos taurus*, de los cuales: 20 corresponden al animal denominado como “10 – Donante”, mismo que fue infectado experimentalmente con una cepa nativa de *T. vivax* proporcionada por el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Matriz – Sangolquí); y 14 sueros corresponden

al animal “11 – Control Positivo”, que fue inoculado con una muestra de sangre del donante con una concentración de un millón de tripanosomas por cada 200 μ L.

Así mismo, para establecer el punto de corte, la sensibilidad y especificidad de la prueba, se analizaron 387 sueros de poblaciones con distinta prevalencia de la enfermedad: Pichincha (141), Pedernales (100), Orellana (98), Tena (19), IASA (21) y Bélgica (8).

Reactivos Específicos

Proteína recombinante “Paraflagelar65kDa” proporcionada por el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Matriz – Sangolquí).

Reactivos Requeridos

Buffer Carbonato – Bicarbonato (CBC): Na_2CO_3 [0.2M] + NaHCO_3 [0.2M].

Cloruro de Sodio (NaCl) al 9%.

Buffer Fosfato Salino (PBS) 1x

Detergente Monolaurato de Poliocietileno–20–sorbitan (Tween20).

Anti-IgG Bovino Conjugado con Peroxidasa (Sigma)

Sustrato: Comprimidos de Diclorhidrato de o-fenilendiamina (OPD) 5mg.

Buffer Citrato: pH 5.0. Ácido Cítrico [0.05M] + Fosfato Disódico [0.05M].

Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 30%.

Equipos Requeridos

Lector de ELISA (Multiscan PLUS, Thermo ELECTRON CORPORATION).

Incubadora (UVP Incubator, Analytik Jena US).

Refrigerador.

Balanza Analítica (Entris™, Sartorius).

Agitador tipo Vórtex (Vortex-Genie™ 2, Scientific Industries SI™).

Pipeta multicanal (Pipet-Lite L8-300XLS+, capacidad de 20 – 300 µL, RAININ).

Estandarización del ELISA Indirecto

Se empleó el protocolo descrito en el Compendio de Protocolos Estándar de Diagnóstico para Tripanosomosis Animal de Origen Africano de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) (Desquesnes et al., 2017) y el protocolo propuesto por Reyna-Bello et al., (2006), con algunas modificaciones (Ver Figura 9), mismas que son descritas a continuación.

Sensibilización de la Placa

Se usó la proteína “Paraflagelar65kDa” como antígeno, para lo cual fue diluida en Buffer CBC a diferentes concentraciones (Ver Tabla 1). Se colocaron 100 µL por pocillo en una placa de poliestireno transparente de 96 pocillos de fondo plano (MicroWell™ Nunc-Immuno™), a continuación, se cubrió la placa con Parafilm y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al finalizar la incubación se descartó el contenido de la placa mediante inversión y, de manera inmediata, se inició el paso de bloqueo.

Bloqueo de la Placa

Se preparó una solución al 5% p/v de leche semidescremada en polvo y PBS 1x. Luego se colocaron 200 µL de esta solución en cada pocillo de la placa. Posteriormente, se cubrió la placa con Parafilm y se incubó a 37°C durante una hora. Al finalizar la incubación se descartó el contenido de la placa mediante inversión y se realizaron los respectivos lavados.

Lavados de Placa

Se preparó el Buffer de Lavado partiendo de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 9% p/v a la que se le adicionó Tween20 (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Los lavados se realizaron colocando 200 μL de Buffer de Lavado en cada pocillo después de cada paso con distintas repeticiones: sin lavados luego de la sensibilización, 3 lavados luego del bloqueo, 5 lavados luego de la adición del anticuerpo primario y 5 lavados luego de la adición del conjugado.

Adición del Anticuerpo Primario

Se emplearon cuatro sueros procedentes de bovinos infectados experimentalmente con *T. vivax*, de estos: A⁺ y B⁺ son positivos a la infección y C⁻ y D⁻ son previos a la infección. Estos sueros se diluyeron en PBS-T (1 mL de Tween20 por cada Litro de PBS) a diferentes concentraciones (Ver Tabla 1) y se colocaron 100 μL de la dilución en su respectivo pocillo, luego se cubrió la placa con Parafilm y se incubó a 37°C durante una hora. Al finalizar la incubación se descartó el contenido de la placa por inversión y se realizaron los lavados correspondientes.

Adición del Conjugado

El conjugado fue diluido en PBS-T a distintas concentraciones (Ver Tabla 1) y se colocaron 100 μL de la dilución en su respectivo pocillo, posteriormente se cubrió la placa con Parafilm y se incubó a 37°C durante una hora. Al finalizar la incubación se descartó el contenido de la placa por inversión y se realizaron los lavados correspondientes.

Adición del Sustrato

En 9 mL de agua destilada se diluyó un comprimido de OPD de 5 mg, luego, se añadió 1 mL de Buffer Citrato y 10 μL de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 30%. Inmediatamente se colocaron 100 μL de la solución en los pocillos correspondientes y se incubó de 10 a 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.

Lectura de Densidades Ópticas

Se registró la densidad óptica de la placa a los 10 y 30 minutos después de la adición del sustrato a una longitud de onda de 405 y 450 nm en el lector de ELISA.

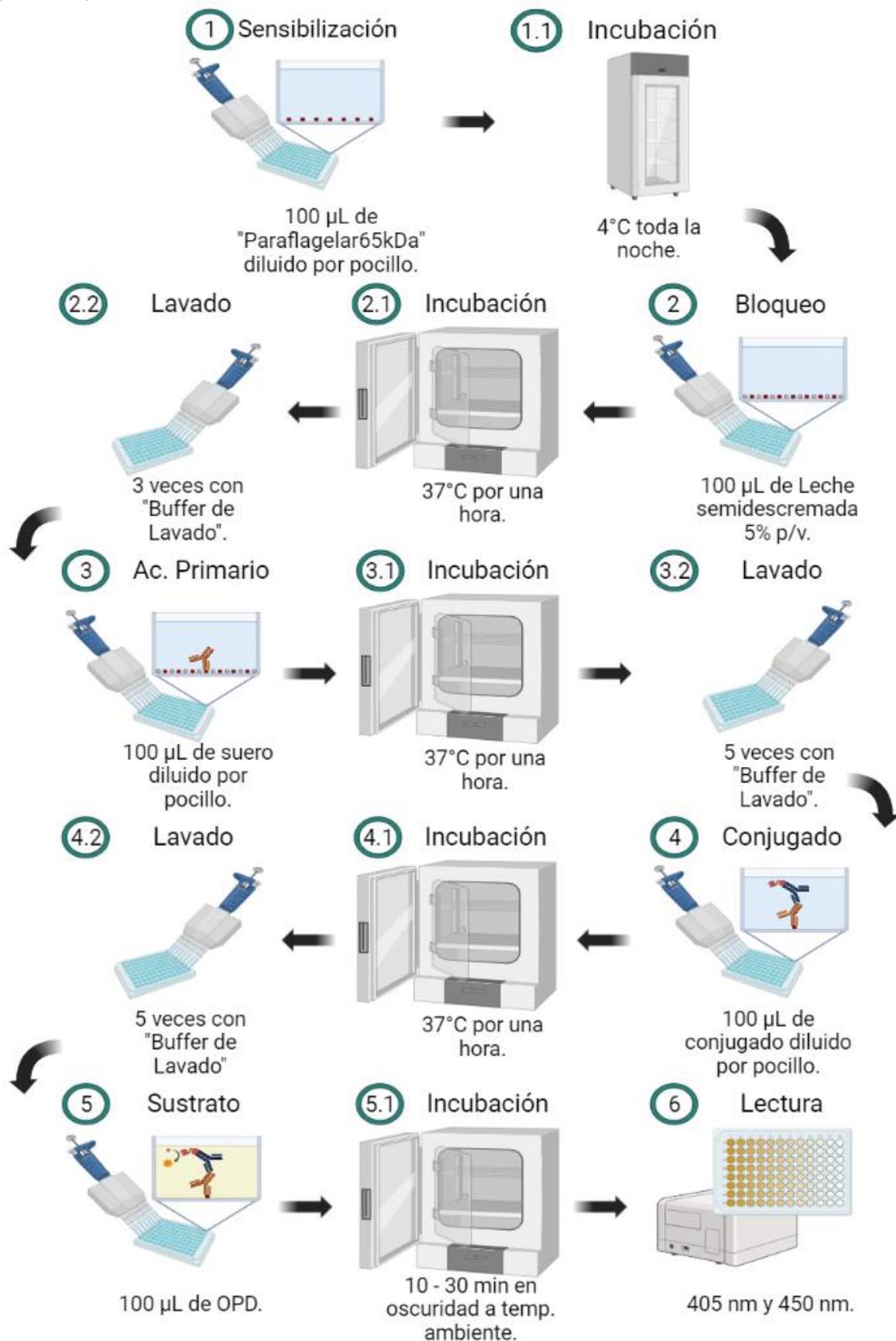
Tabla 1.

Tabla resumen de las variaciones en el proceso de estandarización del ELISA.

N° Ensayo	Dilución del Antígeno	Dilución de los sueros	Dilución del conjugado	Lectura
1	1 µg/mL	1/50	1/2000	10 y 30 minutos a 450 nm.
		1/100		
	2 µg/mL	1/200		
2	0.5 µg/mL	1/100	1/1000	10 y 30 minutos a 450 nm.
		1/200		
	1 µg/mL	1/400		
3	1 µg/mL	1/50	1/500	10 y 30 minutos a 450 nm.
		1/100	1/1000	
		1/200	1/2000	
4	1 µg/mL	1/100	1/1000	10 y 30 minutos a 405 y 450 nm.
		1/200	1/10000	
		1/400	1/40000	
5	1 µg/mL	1/100	1/1000	10 y 30 minutos a 405 y 450 nm.
	2 µg/mL	1/200	1/4000	

Nota. Autoría propia.

Figura 9.
Esquema del proceso de estandarización del ELISA Indirecto.



Nota. Autoría propia.

Establecimiento del Punto de Corte

Con las concentraciones y los parámetros estandarizados, se analizaron 21 sueros procedentes de una zona libre de *T. vivax*, específicamente del ganado bovino de las instalaciones del IASA en Sangolquí. Una vez obtenidas las densidades ópticas se calculó la media y la desviación estándar y se encontró el punto de corte empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Punto de Corte} = \bar{X} + 3\sigma \quad (1)$$

Donde:

\bar{X} : Media o Promedio.

σ : Desviación estándar.

Cinética de Anticuerpos

Con las concentraciones y los parámetros estandarizados, se analizaron los sueros de dos animales infectados experimentalmente con *T. vivax*. Específicamente, se emplearon los sueros del animal “10 – Donante” y del animal “11 – Control Positivo”, que fueron tomados desde el día cero hasta los días 49 y 46 post infección, respectivamente.

Análisis Poblacional

Con el punto de corte establecido y la prueba estandarizada, se analizaron 366 sueros procedentes de poblaciones libres de *Trypanosoma* y con prevalencia de esta enfermedad, con el fin de discriminar entre animales sanos e infectados con *T. vivax*.

Sensibilidad y Especificidad de la Prueba

Se compararon los resultados obtenidos durante el análisis poblacional realizado con el ELISA Indirecto estandarizado y la información presente en la base de datos de la

seroteca del IASA, específicamente, los diagnósticos obtenidos por PCR con el objetivo de calcular la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de la prueba estandarizada, utilizando las siguientes fórmulas:

$$S = \frac{VP}{VP+FN} \quad (2)$$

$$E = \frac{VN}{VN+FP} \quad (3)$$

$$VPP = \frac{VP}{VP+FP} \quad (4)$$

$$VPN = \frac{VN}{VN+FN} \quad (5)$$

Donde:

S: Sensibilidad

E: Especificidad

VPP: Valor Predictivo Positivo

VPN: Valor Predictivo Negativo

VP: Verdaderos Positivos

VN: Verdaderos Negativos

FP: Falsos Positivos

FN: Falsos Negativos

Análisis Funcional

Se seleccionaron las condiciones óptimas para el ELISA indirecto con base a los mejores resultados derivados del análisis de la Razón Positivos/Negativos de cada ensayo.

D. Resultados

Estandarización del Elisa Indirecto

Al analizar la Razón Positivos/Negativos de cada ensayo (Ver Tabla 2) se estableció que las condiciones óptimas para la detección de *T. vivax* mediante un ELISA Indirecto usando la proteína recombinante “Paraflagelar65kDa” como antígeno, fueron: concentración de antígeno de 2 µg/mL, dilución de suero 1/200, dilución de conjugado 1/4000, 30 minutos de incubación con el sustrato y lectura de absorbancia a 405 nm (Ver Tabla 3).

Tabla 2.

Mejores valores de la razón Positivos/Negativos obtenidos durante la estandarización.

Repetición	Condiciones					Razón Positivos/Negativos
	Antígeno	Sueros	Conjugado	Sustrato	Lectura	
1	1 µg/mL	1/200	1/2000	30 min	450 nm	1.6989 UA
2	1 µg/mL	1/400	1/2000	30 min	450 nm	1.4332 UA
3	1 µg/mL	1/200	1/2000	30 min	450 nm	1.1711 UA
4	1 µg/mL	1/400	1/10000	30 min	450 nm	2.0289 UA
5	2 µg/mL	1/200	1/4000	30 min	405 nm	3.4668 UA

Nota. Autoría propia.

Tabla 3. *Condiciones óptimas del ELISA indirecto estandarizado.*

Condiciones óptimas del ELISA indirecto estandarizado.

Antígeno	Sueros	Conjugado	Sustrato	Lectura
2 µg/mL	1/200	1/4000	30 min	405 nm

Nota. Autoría propia.

Establecimiento del Punto de Corte

Se examinaron 21 sueros procedentes del ganado bovino de las instalaciones del IASA en Sangolquí – Ecuador (Ver Anexo B). Como se observa en la Figura 11, los sueros presentaron una densidad óptica comprendida entre 0.200 y 0.500 UA. Utilizando estos resultados y la Ecuación 1, se determinó que el punto de corte del ELISA Indirecto estandarizado se encuentra en 0.575 UA.

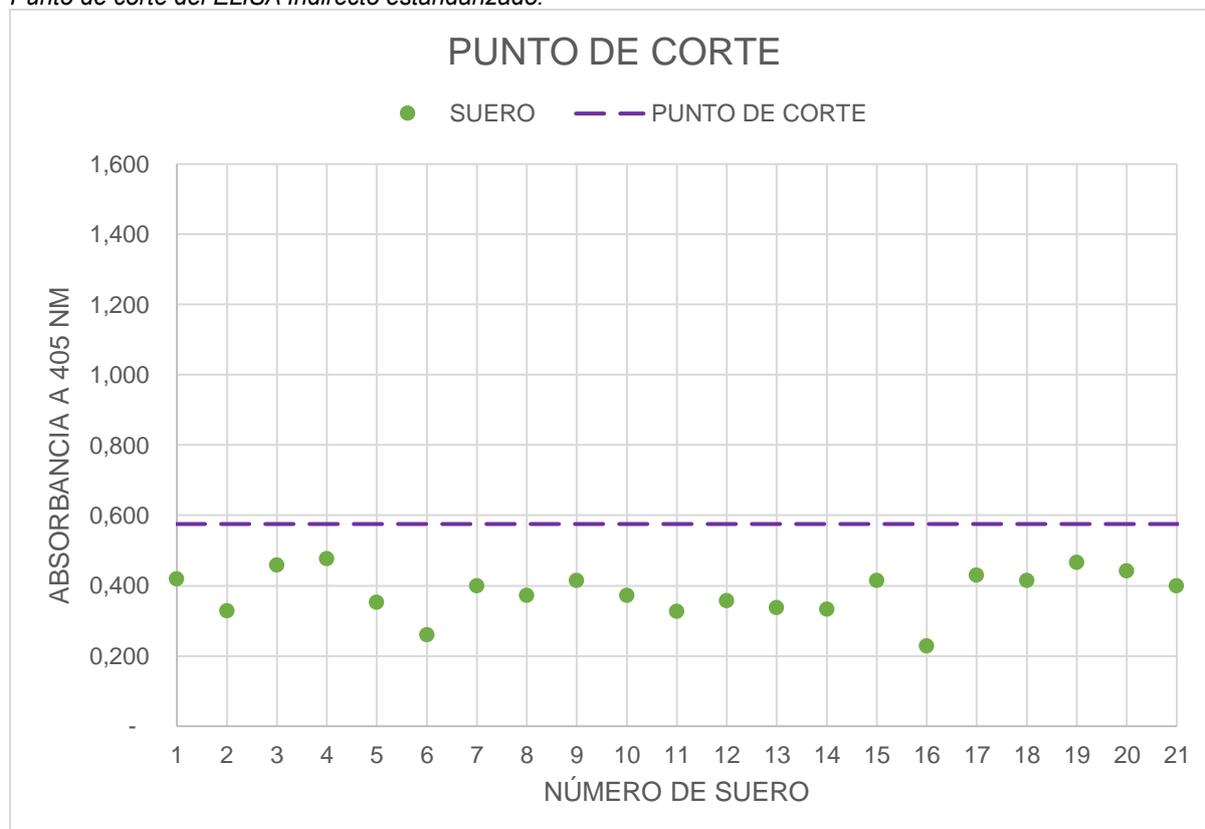
$$\text{Punto de Corte} = \bar{X} + 3\sigma \quad (1)$$

$$\text{Punto de Corte} = 0.381 + 3(0.065)$$

$$\text{Punto de Corte} = 0.575$$

Figura 10.

Punto de corte del ELISA Indirecto estandarizado.

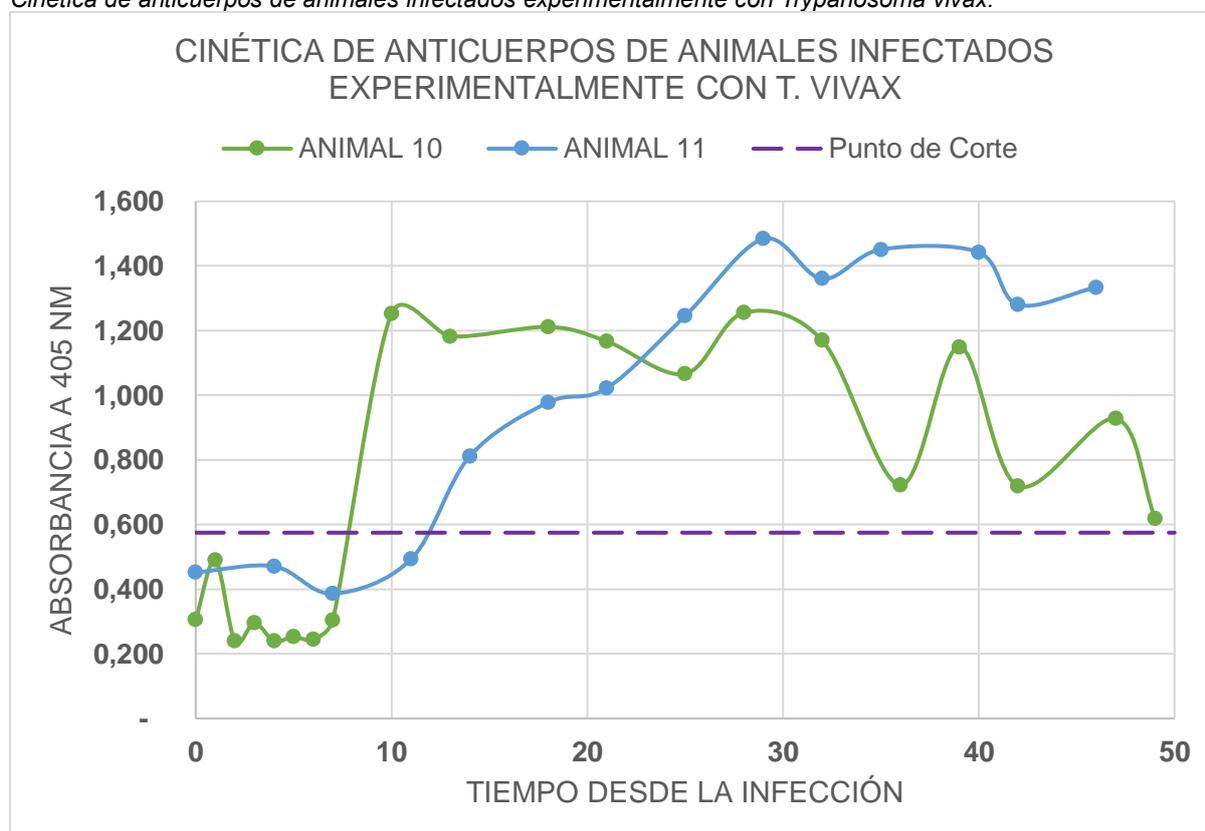


Nota. Autoría propia.

Cinética de Anticuerpos

Al analizar la evolución de la infección experimental en los bovinos “10 – Donante” y “11 – Control Positivo” desde el día cero (día de la infección) hasta los días 46 y 49 post infección, respectivamente (Ver Figura 10), se pudo constatar que el ELISA Indirecto estandarizado demostró su capacidad para detectar la seroconversión después de la infección, siendo visible en el día 10 para el Donante y en el día 14 para el Control Positivo. Para determinar con precisión el momento de seroconversión se empleó el punto de corte obtenido con anterioridad (0.575 UA) (Ver Figura 11).

Figura 11.
Cinética de anticuerpos de animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*.



Nota. Autoría propia.

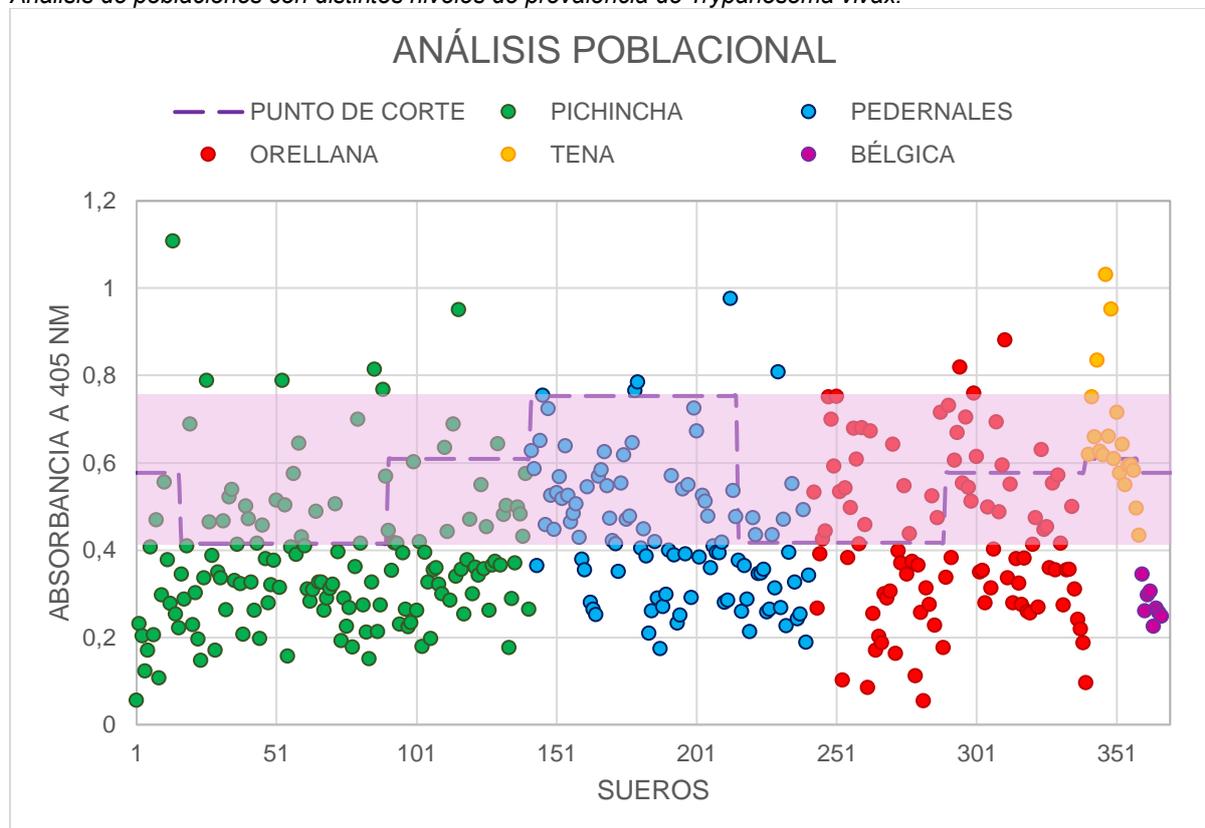
Análisis Poblacional

Se evaluó un total de 366 sueros de poblaciones con distintos niveles de prevalencia de *T. vivax*. Tal como se muestra en la Figura 12 y la Tabla 3, se encontró que la población de Tena presenta la mayor prevalencia de este hemoparásito, con un porcentaje de 63,19%,

en comparación al resto de las poblaciones estudiadas. Por otro lado, al analizar los sueros de una población procedente de Bélgica, todos los resultados fueron negativos.

Figura 12.

Análisis de poblaciones con distintos niveles de prevalencia de Trypanosoma vivax.



Nota. La región marcada de violeta representa el umbral de corte general de la prueba. Autoría propia.

Tabla 4.

Porcentaje de prevalencia de Trypanosoma vivax en las poblaciones analizadas.

Población	Total	Positivos	Negativos	Prevalencia
Pichincha	141	29	112	20.57 %
Pedernales	100	8	92	8.00 %
Orellana	98	33	65	33.67 %
Tena	19	12	7	63.16 %
Bélgica	8	0	8	00.00 %

Nota. Autoría propia.

Sensibilidad y Especificidad de la Prueba

Al comparar los resultados obtenidos durante el análisis poblacional con la información disponible en la base de datos de la seroteca del IASA, se estableció la sensibilidad y especificidad de la prueba de cada población (Ver Tablas 5 – 8) y de forma global (Ver Tabla 9). Obteniendo en general una Sensibilidad de 5.26%, Especificidad de 76.65%, Valor predictivo Positivo de 1.21% y Valor Predictivo Negativo de 93.66%.

Tabla 5.
Características del ELISA estandarizado en la población de Pichincha.

Pichincha		PCR		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	0	29	29
	Negativos	0	112	112
	Total	0	141	141
<i>Sensibilidad</i>		0.00%		
<i>Especificidad</i>		79.43%		
<i>Valor Predictivo Positivo</i>		0.00%		
<i>Valor Predictivo Negativo</i>		100%		

Nota. Autoría propia.

Tabla 6.
Características del ELISA estandarizado en la población de Pedernales.

Pedernales		PCR		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	0	8	8
	Negativos	10	82	92
	Total	10	90	100
<i>Sensibilidad</i>		0.00%		
<i>Especificidad</i>		91.11%		
<i>Valor Predictivo Positivo</i>		0.00%		
<i>Valor Predictivo Negativo</i>		89.13%		

Nota. Autoría propia.

Tabla 7.
Características del ELISA estandarizado en la población de Orellana.

Orellana		PCR		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	0	33	33
	Negativos	4	61	65
	Total	4	94	98
<i>Sensibilidad</i>		0.00%		
<i>Especificidad</i>		64.89%		
<i>Valor Predictivo Positivo</i>		0.00%		
<i>Valor Predictivo Negativo</i>		95.91%		

Nota. Autoría propia.

Tabla 8.
Características del ELISA estandarizado en la población de Tena.

Tena		PCR		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	1	11	12
	Negativos	4	3	7
	Total	5	14	19
<i>Sensibilidad</i>		20.00%		
<i>Especificidad</i>		21.42%		
<i>Valor Predictivo Positivo</i>		8.33%		
<i>Valor Predictivo Negativo</i>		42.85%		

Nota. Autoría propia.

Tabla 9.
Características generales del ELISA estandarizado.

Global		PCR		
		Positivos	Negativos	Total
ELISA	Positivos	1	81	82
	Negativos	18	266	284
	Total	19	347	366
<i>Sensibilidad</i>		5.26%		
<i>Especificidad</i>		76.65%		
<i>Valor Predictivo Positivo</i>		1.21%		
<i>Valor Predictivo Negativo</i>		93.66%		

Nota. Autoría propia.

E. Discusión

Estandarización del ELISA Indirecto y Establecimiento del Punto de Corte

En el presente estudio se estandarizó un ELISA para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma vivax* usando la proteína recombinante “Paraflagelar65KDa”, cuyas condiciones óptimas fueron: concentración de antígeno de 2 µg/mL, dilución de suero 1/200, dilución de conjugado 1/4000, 30 minutos de incubación con el sustrato y lectura de absorbancia a 405 nm.

A partir de estas condiciones, se estableció el punto de corte en 0.575 DO lo cual posibilitó la discriminación entre sueros positivos y negativos. Para esto se analizaron 21 sueros del IASA en la ciudad de Sangolquí, una zona considerada “Libre de *Trypanosoma spp.*”. Según la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) (2022), se considera a una zona como libre de *Trypanosoma spp.* cuando no se han reportado casos durante los últimos dos años, lo que concuerda con la bibliografía, puesto que hasta la fecha no se ha reportado ningún caso de Tripanosomosis bovina en la ciudad de Sangolquí. Además, los sueros usados fueron analizados previamente por PCR, confirmando la ausencia de este parásito en esta zona.

Además de esto, otro factor que considerar al evaluar esta población, es la presencia del vector en la región de estudio, en América esta enfermedad es transmitida mecánicamente por los Tabánidos y por *Stomoxys spp.* Estos organismos habitan en territorios con un alto índice de humedad y regiones regular o estacionalmente inundadas por agua dulce o salobre, especialmente en diversas regiones ubicadas al norte y al sur del Río Amazonas, debido a que las zonas acuáticas son esenciales para el desarrollo temprano de estos vectores (Baldacchino et al., 2014; Foil & Hogsette, 1994). En este contexto, se tiene que en Sangolquí existe un promedio de precipitaciones anuales de 1,000 mm lo que se considera bajo, en comparación con regiones amazónicas como Orellana o

Napo, donde las precipitaciones anuales oscilan entre los 2,000 – 7,000 mm (GADPO, 2020) y 4,000 mm (Ron, 2014), respectivamente, y donde ya se ha evidenciado la presencia de estos vectores (Jumbo Valencia & Reyna Bello, 2021).

Cinética de Anticuerpos

En la Figura 10 se observa que dos bovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* seroconvirtieron a los 10 y 14 postinfección. Esto concuerda con lo postulado por Desquesnes, Gonzatti, et al. (2022), quienes indican que, mediante la técnica de ELISA, la seroconversión positiva se presenta en un rango de 10 a 20 días luego de la infección. Durante ese periodo, los linfocitos B vírgenes se activan por el estímulo del antígeno, se diferencian a células plasmáticas y secretan anticuerpos específicos para la detección de este antígeno, los cuales se mantienen elevados mientras persista el estímulo del antígeno (Abbas et al., 2009), alcanzando concentraciones de IgG en sangre de 1,700 – 1,500 mg/dl, mientras que la IgM llega a una concentración de 250 – 400 mg/dl en la sangre del bovino (Tizard, 2009).

Análisis Poblacional

Como se observa en la Figura 12 y en los Anexos A – D, al analizar la seroprevalencia en diversas poblaciones el punto de corte presenta variaciones, esto se debe a que, al ser un ELISA casero, se realiza un punto de corte en cada ensayo, comprometiendo la reproducibilidad de este tipo de ELISAs (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022).

Al estudiar los sueros procedentes de la provincia de Pichincha, se obtuvo una seroprevalencia del 20.57%. Esta cifra contrasta significativamente con la prevalencia observada en el trabajo realizado por Osorio Añazco y Ron Román (2022), que registró un 0.39% a nivel de hato bovino mediante la técnica de Woo. Esta técnica permite establecer la presencia del parásito en la sangre del animal entre 6 – 10 días luego de haber sido

infectado y arroja resultados negativos luego del tratamiento del animal (Woo, 1969). En contraparte, ELISA es capaz de detectar la presencia de anticuerpos en circulación, corroborando el contacto entre el parásito y el hospedador, incluso luego del tratamiento (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022). Esto puede explicar la inconsistencia de los resultados. Aunado a esto, justamente en ese rebaño, ocurrió un brote de babesia (Chávez-Larrea, Cholota-Iza, et al., 2021) y el tratamiento contra agentes hemotrópicos, puede haber minimizado los positivos por PCR.

En la provincia de Manabí, específicamente en Pedernales, la prevalencia obtenida fue del 8.0%, una cifra cercana al valor obtenido por Cáceres Sabay y Ramírez Iglesias (2022), que fue de 16.83% encontrándose 17 casos positivos en los 101 sueros analizados mediante ELISAi. Es importante considerar que en este estudio se empleó un extracto de antígeno clarificado de un aislado venezolano de *T. equiperdum* (TeAp-N/D1) (Hinojosa Castillo & Ramírez Iglesias, 2021), por lo que se presume que los bovinos analizados pudieron haberse infectado de otro tripanosomatideos ajenos a *T. vivax*.

Este antígeno también fue usado en los estudios supervisados por Ramírez Iglesias, que fueron realizados por Maldonado Cardona (2022) e Hinojosa Castillo (2021) sobre la seroprevalencia en las provincias de Napo y Orellana, donde obtuvo una seroprevalencia de 6.82% – 42.86% y 8.43% – 22.22%, respectivamente. Contrastando con los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, donde se obtuvo una seroprevalencia de 63.16% para la ciudad de Tena en la Provincia de Napo y 33.67% en la provincia de Orellana. Una vez más, se atribuyen estas inconsistencias a los diferentes antígenos usados durante el análisis.

Finalmente, al estudiar los sueros de una población bovina de Bélgica, se obtuvo una prevalencia del 0.0%, esta información concuerda con la bibliografía, puesto que el Reino de Bélgica se localiza al norte de Europa Central, limitando con Países bajos, Alemania, Luxemburgo y Francia (Chelminsky et al., 2020) y con base a los lineamientos

establecidos por la OIE de la Organización Mundial de la Salud Animal (2022), se considera este territorio como una zona libre de *Trypanosoma spp.*

Sensibilidad y Especificidad

Al comparar los resultados obtenidos mediante el ELISA Indirecto estandarizado, con la información presente en la base de datos de la seroteca del IASA, específicamente los diagnósticos obtenidos por PCR, se encontró que los datos disponibles en la seroteca no cumplen con las necesidades de este estudio debido a que gran parte de los sueros analizados mediante ELISA no fueron analizados previamente por PCR (Ver Anexos E – I), razón por la cual, se encontraron inconsistencias al momento de determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del ELISA. Estas pueden atribuirse a diversos factores.

La sensibilidad es la capacidad de la prueba clasificar correctamente como positivo a un individuo infectado, mientras que la especificidad, es la capacidad de la prueba de arrojar resultados negativos para individuos sanos. Así mismo, el valor predictivo positivo o VPP es la cuantificación porcentual de los individuos positivos que realmente tienen la enfermedad, contrario al valor predictivo negativo (VPN), que representa el porcentaje de individuos negativos que no están enfermos (Parikh et al., 2008). Estos valores están directamente relacionados. Por lo tanto, cuando se obtiene una sensibilidad baja (0.00%), esto se traduce en un valor predictivo positivo (VPP) igualmente bajo (0.00%). De manera similar, si la especificidad es alta (79.43%), el valor predictivo negativo (VPN) será también alto (100%) (Ver Tabla 5).

Como se observa en las Tablas 5, 6 y 7, en poblaciones como Pichincha, Pedernales y Orellana se obtuvo una sensibilidad y un Valor Predictivo Positivo de 0.00%, debido a que los resultados positivos obtenidos mediante el ELISAi estandarizado no coincidían con los obtenidos por PCR. Según Desquesnes, Sazmand, et al. (2022), la detección de

anticuerpos mediante pruebas serológicas permite que el investigador corrobore el contacto entre el parásito y el animal, mas no necesariamente establece una infección activa puesto que la Inmunoglobulina IgG se genera en los primeros 10 – 20 días y permanece en el cuerpo del bovino de 2 a 3 meses después de haber superado la infección. Por lo tanto, es posible que el ELISAI este detectando anticuerpos derivados de infecciones anteriores en lugar de reconocer la presencia activa del parásito en el momento del análisis, explicando la ausencia de resultados positivos obtenidos por PCR, lo que reduce la sensibilidad y el VPP de la prueba a cero.

Por otro lado, en las Tablas 6, 7 y 8, se observa que algunos de los sueros catalogados como negativos por el ELISAI estandarizado, resultan positivos al analizarse por PCR, estos valores, llamados falsos negativos (Parikh et al., 2008), pueden justificarse al considerar el periodo de la infección durante el cual se tomó la muestra. Las pruebas que detectan la presencia de IgG señalan una infección establecida, es decir, una infección que ocurrió en el pasado o está en curso. Por otro lado, las pruebas parasitológicas y moleculares detectan la presencia del parásito en la sangre del animal o una infección activa (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022). Por lo tanto, si el animal se encuentra en etapas tempranas de la infección (10 a 20 días) (Desquesnes, Gonzatti, et al., 2022), es posible detectar la presencia del parásito, pero los anticuerpos no estarán presentes en la circulación sanguínea.

Cabe recalcar, que existen animales infectados pero que no presentan síntomas visibles, lo que se conoce como infección asintomática (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022). Estos, al ser analizados por métodos serológicos, parasitológicos y moleculares, pueden arrojar resultados positivos a pesar de haber sido diagnosticados como negativos mediante el análisis clínico.

La sensibilidad global de la prueba fue de 5.26% que, según Desquesnes y Sazmand (2022) y Fernandes Ferreira (2022) se considera un valor sumamente bajo,

debido a que los ELISAs usados para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina causada por *T. vivax* tienen una sensibilidad de 95 – 98%. Si bien esto puede justificarse por los factores mencionados anteriormente, existe una variable adicional a considerar, que es la pureza de la proteína.

Las proteínas recombinantes están diseñadas para tener una cola de Histidina al final de su estructura, lo que facilita el proceso de purificación mediante sustratos con afinidad a esta molécula. La co-purificación de proteínas nativas de *Escherichia coli* junto con la proteína recombinante de interés es algo común. Algunas proteínas de *E. coli* tienen un alto contenido de histidina, lo que puede afectar el proceso de purificación. Un ejemplo es la Glucosamina-6-fosfato sintasa (GlmS), una proteína de 67KDa con varias regiones ricas en histidina en su superficie, lo que le permite unirse a resinas quelantes de metales que se utilizan con frecuencia en la purificación de proteínas recombinantes (Bolanos-García & Davies, 2006).

Dado su peso molecular, GlmS se asemeja mucho a la proteína utilizada en este ensayo, "Paraflagelar65KDa" o PFR1 (69.66KDa) (Tavares Marques et al., 2013). Por lo tanto, podría haber ocurrido una co-purificación de GlmS junto con PFR1, y este posible error podría haber pasado desapercibido debido a sus tamaños similares. Además, debido a sus tamaños comparables, la purificación podría haber capturado exclusivamente a GlmS, lo que haría que el ELISA estandarizado detectara anticuerpos anti-*E. coli* en lugar de anticuerpos anti-*T. vivax*.

Finalmente, la especificidad general de la prueba se ubicó en 76.65%, un valor que podría considerarse relativamente bajo en comparación con los valores comúnmente obtenidos en otros estudios, que se ubican alrededor del 95% (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022; Fernandes Ferreira et al., 2022). A pesar de este resultado, es importante destacar que la prueba ha demostrado su capacidad para identificar con certeza a los

animales libres de infección ya que, de 366 animales analizados, 266 resultaron ser verdaderos negativos, reflejándose en el valor predictivo negativo (93.66%).

Importancia del Estudio

Este trabajo de titulación constituye la tercera fase de una investigación más amplia. La etapa inicial abordada por Tavares Marques (2013) se centró en la proteómica, a través de la cual se identificaron cinco proteínas de interés con posible aplicación en el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina originada por *T. vivax*. Entre estas candidatas, destaca la PFR1 como la más prometedora.

En una etapa posterior, en su propia tesis, Bedoya Páez (2022) llevó a cabo la clonación, expresión y purificación de la proteína PFR1 y, mediante el empleo de un suero bovino positivo a *T. vivax* en análisis de Western Blot. Además, evaluó su potencial antigénico mediante la técnica de Western Blot, utilizando suero bovino positivo para *T. vivax* como reactivo. Los resultados de estas investigaciones resaltan la viabilidad de la proteína PFR1 como un candidato destacado para ser sometido a evaluaciones posteriores como un método diagnóstico.

Finalmente, en la presente tesis, se llevó a cabo una evaluación del potencial de la PFR1 como antígeno para la detección de *T. vivax*, arrojando resultados favorables. No obstante, se requieren ulteriores estudios para validar con certeza la confiabilidad de la prueba.

La Tripanosomosis bovina acarrea significativas pérdidas económicas en el ámbito ganadero, derivadas de sus expresiones clínicas que incluyen fiebre, anemia, pérdida de peso, disminución en la producción lechera y deterioro de la actividad reproductiva en los animales (Gonzatti et al., 2014). En consecuencia, esta enfermedad ha causado pérdidas de magnitud billonaria en África y millonaria en Latinoamérica. En países como Argentina,

Brasil, Bolivia y Colombia, ya se han registrado pérdidas considerables (Desquesnes, Sazmand, et al., 2022; Fetene et al., 2021).

Aunque en Ecuador no se han documentado informes al respecto, es importante señalar que el país alberga 3.9 millones de cabezas de ganado, dispersas a lo largo de su territorio (INEC, 2023a), y que se encuentran en riesgo de contraer Tripanosomosis bovina si no se implementan medidas efectivas para controlar esta enfermedad, como el diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado.

El diagnóstico especie-específico de la Tripanosomosis bovina, es sumamente importante, ya que los tratamientos disponibles para esta enfermedad muestran variaciones en su efectividad según el tripanosomatidio que infecte al animal. Por ejemplo, el Suramin es eficaz contra *T. brucei* y *T. evansi*, pero carece de eficacia contra *T. congolense* y *T. vivax*. Además, es importante tener en cuenta que este fármaco puede generar irritación en el lugar de la infección y manifestar toxicidad en dosis específicas (Uilenberg, 1998). Por ende, también es necesario considerar las posibles implicaciones para la salud del animal al emplear determinados tratamientos.

Por otro lado, el Diminazeno exhibe una alta efectividad contra *T. congolense* y *T. vivax*, pero no impacta en *T. evansi* y *T. brucei*. De manera similar, el bromuro de etidio ha sido empleado con éxito en el tratamiento de la Tripanosomosis causada por *T. congolense*, mientras que su eficacia varía para *T. vivax* y *T. brucei*, demostrando ser menos efectivo en ciertas concentraciones. Cabe destacar que se ha documentado la aparición de resistencia a ciertas drogas en algunos tripanosomas, como *T. evansi*, que ha desarrollado resistencia al Metil Sulfato de Quinapyramine (Uilenberg, 1998).

En este contexto es importante tomar en cuenta la respuesta de cada especie de tripanosomatidio frente a los agentes terapéuticos mencionados, enfatizando la necesidad de un método de diagnóstico específico y preciso para la Tripanosomosis bovina,

permitiendo la selección del tratamiento más apropiado, evitando causar daño innecesario al animal, disminuyendo la posibilidad de la resistencia a estas drogas y reduciendo las posibles pérdidas económicas.

F. Conclusiones

En el presente estudio se estandarizó un ELISA indirecto utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65KDa como antígeno, con el propósito de diagnosticar la Tripanosomosis bovina causada por *T. vivax*.

Una vez completada la estandarización, se determinaron las condiciones óptimas para el ensayo. La concentración óptima de antígeno se estableció en 2 µg/mL, mientras que las diluciones adecuadas para el suero y el conjugado fueron 1/200 y 1/4000, respectivamente. Para revelar los resultados, la placa se incubó con OPD durante 30 minutos, para finalizar con la lectura de la absorbancia a 405 nm.

Para validar la fiabilidad del ELISA estandarizado, se realizó una cinética de anticuerpos, que implicó el análisis de 34 sueros bovinos procedentes de infecciones experimentales, demostrando la capacidad de la prueba para detectar la seroconversión en animales infectados y, en consecuencia, la presencia de anticuerpos generados como respuesta a la infección por *T. vivax*.

Así mismo, se evaluaron 366 sueros pertenecientes a las poblaciones: Pichincha, Pedernales, Orellana, Tena y Bélgica, con el fin de determinar la seroprevalencia de la Tripanosomosis bovina en estas regiones, misma que fue de 20.57%, 8.00%, 33.67%, 63.16% y 0.00%, respectivamente, demostrando que el ELISA estandarizado es capaz de diferenciar de manera efectiva entre animales sanos e infectados.

El estudio resalta la importancia de desarrollar métodos de diagnóstico capaces de identificar de manera específica las diferentes especies de *Trypanosoma* spp. Esto juega un papel fundamental en la mitigación de las pérdidas económicas al permitir la implementación de tratamientos precisos y adecuados para los animales afectados, al tiempo que disminuye la probabilidad de que los parásitos desarrollen resistencia a los medicamentos.

G. Recomendaciones

Con base a los resultados obtenidos durante el presente estudio, se recomienda emplear la proteína recombinante Paraflagelar65KDa como antígeno, tanto en futuras investigaciones como en la detección rutinaria de la Tripanosomosis bovina causada por *T. vivax*.

Para tener una imagen completa del estado de la enfermedad en los animales, se recomienda realizar análisis parasitológicos y moleculares en conjunto con el análisis serológico en poblaciones con alta prevalencia, a fin de tener una imagen epidemiológica completa del rebaño.

Con la finalidad de validar completamente el ensayo de ELISA utilizando Paraflagelar65KDa, se debe contrastar los resultados de PCR con el ELISA, en una población que posea una prevalencia superior al 30% por PCR, donde no se esté seguro de la no existencia de tratamiento, de modo que facilite la determinación de la sensibilidad, especificidad, Valor Predictivo Positivo (VPP) y Valor Predictivo Negativo (VPN) de la prueba diagnóstica.

En ensayos futuros se recomienda abordar la detección de IgM en las muestras serológicas. Esta inmunoglobulina se produce en etapas tempranas de la infección y tiene un corto tiempo de vida (1 – 3 meses) por lo que permitirá la detección de infecciones activas.

H. Bibliografía

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2009). *Inmunología celular y molecular* (9th ed.). Elsevier.
- Abdala, A. A., Larriestra, A. J., & Signorini, M. (2020). Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Revista Veterinaria*, 31(2), 115–119.
- Abuabara Pérez, Y., & Otte, M. J. (1989). Pérdidas económicas por infecciones de *Trypanosoma vivax* en Colombia. *Seminario Internacional Sobre Diagnóstico, Epidemiología, y Control de Enfermedades Hemoparasitarias*, 96–101.
- Alves, A. L., Osório, R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Raquel, L., Ribeiro, R., & Celso Gonçalves Da Costa, S. (2008). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World-A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 103(1), 1–13.
- Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L. D., Duvallet, G., & Jittapalapong, S. (2014). Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infection, Genetics and Evolution*, 28, 596–615.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.029>
- Bolanos-Garcia, V. M., & Davies, O. R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(9), 1304–1313. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>
- Burgos Chávez, M. A., & Ramírez Iglesias, J. R. (2021). *Determinación de la Seroprevalencia de la Tripanosomosis Bovina Causada por Trypanosoma spp. en la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas* [Tesis de Grado, Universidad

Internacional SEK].

<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4239/1/Burgos%20Ch%c3%a1vez%20%20Mar%c3%ada%20Alejandra.pdf>

Cáceres Sabay, A. I., & Ramírez Iglesias, J. R. (2022). *Seroprevalencia de*

Tripanosomosis Animal en la Región Costa del Ecuador [Tesis de Grado,

Universidad Internacional SEK].

<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4658/1/C%c3%a1ceres%20Sabay%20%20Alejandra%20Isabela.pdf>

Camargo, R., Izquier, A., Uzcanga, G. L., Perrone, T., Acosta-Serrano, A., Carrasquel,

L., Arias, L. P., Escalona, J. L., Cardozo, V., & Bubis, J. (2015). Variant surface glycoproteins from Venezuelan trypanosome isolates are recognized by sera from animals infected with either *Trypanosoma evansi* or *Trypanosoma vivax*.

Veterinary Parasitology, 207(1–2), 17–33.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.11.004>

Chávez-Larrea, M. A., Cholota-Iza, C., Medina-Naranjo, V., Yugcha-Díaz, M., Ron-

Román, J., Martín-Solano, S., Gómez-Mendoza, G., Saegerman, C., & Reyna-Bello, A. (2021). Detection of *Babesia* spp. in high altitude cattle in Ecuador,

possible evidence of the adaptation of vectors and diseases to new climatic conditions. *Pathogens*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/pathogens10121593>

Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R.,

Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2021). First report and molecular identification of *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4),

2422–2428. <https://doi.org/10.1111/tbed.13906>

Chelminsky, A., López González, M. R., & Guerrero Valencia, G. (2020). *Reino de Bélgica - Ficha Técnica*.

https://centrogilbertobosques.senado.gob.mx/docs/F_Belgica.pdf

Corporación Financiera Nacional B.P. (2023). *FICHA SECTORIAL LECHE Y SUS DERIVADOS*. [https://www.cfn.fin.ec/wp-](https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2023/fichas-sectoriales-1-trimestre/Ficha-Sectorial-Leche-y-Derivados.pdf)

[content/uploads/downloads/biblioteca/2023/fichas-sectoriales-1-trimestre/Ficha-Sectorial-Leche-y-Derivados.pdf](https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2023/fichas-sectoriales-1-trimestre/Ficha-Sectorial-Leche-y-Derivados.pdf)

Desquesnes, M., Bengaly, Z., Berthier, D., Bossard, G., Cene, B., Ilboudo, H., Jamonneau, V., Kaboré, J., Mémé, Y., Millogo, L., Ravel, S., Sakandé, H., Sanogo, L., Thévenon, S., Yoni, W., Zoungrana, A., & Barton, N. (2017). *COMPENDIUM OF STANDARD DIAGNOSTIC PROTOCOLS FOR TRYPANOSOMOSES OF AFRICAN ORIGIN*. OIE.

Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazmand, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., Gimonneau, G., Truc, P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Jamonneau, V., Jittapalapong, S., Jacquiet, P., Solano, P., & Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites and Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>

Desquesnes, M., Sazmand, A., Gonzatti, M., Boulangé, A., Bossard, G., Thévenon, S., Gimonneau, G., Truc, P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Waleckx, E., Jamonneau, V., Jacquiet, P., Jittapalapong, S., Berthier, D., Solano, P., & Hébert, L. (2022). Diagnosis of animal trypanosomoses: proper use of current tools and future prospects. *Parasites and Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05352-1>

Desquesnes, Marc. (2004). *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin American*. World Organization for Animal Health.

- Eyssen, L. E. A., Vather, P., Jackson, L., Ximba, P., Biteau, N., Baltz, T., Boulangé, A., Büscher, P., & Coetzer, T. H. T. (2018). Recombinant and native TviCATL from *Trypanosoma vivax*: Enzymatic characterization and evaluation as a diagnostic target for animal African trypanosomosis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 223, 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.07.001>
- Fernandes Ferreira, A. V., Caetano Garcia, G., Fortes de Araújo, F., Moreira Nogueira, L., Figueiredo Bittar, J. F., Resende Bittar, E., Andrade Padolfi, I., Martins-Filho, O. A., Sobreira Galdino, A., & Silva Araújo, M. S. (2022). Methods Applied to the Diagnosis of Cattle *Trypanosoma vivax* Infection: An Overview of the Current State of the Art. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 24(3), 355–365. <https://doi.org/10.2174/1389201024666221108101446>
- Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites and Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x>
- Foil, L. D., & Hogsette, J. A. (1994). Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 13(4), 1125–1158. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20506/rst.13.4.821>
- GADPO. (2020). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Provincia de Orellana 2020 - 2023*. https://www.gporellana.gob.ec/wp-content/uploads/2021/03/PDyOT_GADPO-LINEAMIENTOS_POST_PANDEMIA_2019-2023.pdf
- García, J. (2005). *Caracterización de la antigenicidad cruzada entre Trypanosoma vivax y Trypanosoma evansi mediante la técnica de Inmunotinción (Western Blot)* [Tesis de Posgrado, Universidad Central de Venezuela]. <http://sibucv.ucv.ve/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=232632>

- Gomide Pinheiro, G. R., Lopes Ferreira, L., Teixeira Silva, A. L., Santos Cardoso, M., Ferreira-Júnior, Á., Steindel, M., Grisard, E. C., Miletti, L. C., Castanheira Bartholomeu, D., Lacerda Bueno, L., Lima Santos, R., & Toshio Fujiwara, R. (2021). A recombinant protein (MyxoTLM) for the serological diagnosis of acute and chronic *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 296. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109495>
- Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In S. Magez & M. Radwanska (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261–285). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5>
- Greif, G., Ponce de Leon, M., Lamolle, G., Rodriguez, M., Piñeyro, D., Tavares-Marques, L. M., Reyna-Bello, A., Robello, C., & Alvarez-Valin, F. (2013). Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC Genomics*, 14(149). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-149>
- Hinojosa Castillo, D. A., & Ramírez Iglesias, J. R. (2021). *Determinación de la Seroprevalencia de Tripanosomosis Bovina Causada por Trypanosoma spp- en Tres Provincias del Oriente Ecuatoriano (Napo, Orellana, Sucumbíos)* [Tesis de Grado, Universidad Internacional SEK]. <https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4253/1/Hinojosa%20Castillo%2c%20Danilo%20Alexander.pdf>
- Hoare, C. A. (1956). Evolutionary Trends in Mammalian Trypanosomes. *Adv. Parasitol.*, 5(47).
- INEC. (2023a). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/Bolet%C3%ADn_tecnico_ES
PAC_2022.pdf

INEC. (2023b). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2022*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2022/PPT_%20ESPAC_%202022_04.pdf

Jumbo Valencia, J. G., & Reyna Bello, A. (2021). *Prevalencia de trypanosoma vivax en moscas hematófagas recolectadas en distintas zonas del Ecuador con previos reportes de enfermedades hemotrópicas*. [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25922/1/T-ESPESD-003172.pdf>

Leger, M., & Vienne, M. (1919). Epizootie à trypanosomes chez les Bovidés de la Guyane Française. *Bulletin de La Societe de Pathologie Exotique Paris*, 12, 258–266.

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. <https://doi.org/10.1007/bf02297393>

Maga, J. A., & LeBowitz, J. H. (n.d.). *Unravelling the kinetoplastid paraflagellar rod*.

Maldonado Cardona, C. A., & Ramírez Iglesias, J. R. (2022). *Seroprevalencia de Tripanosomosis Bovina en la Región Amazónica del Ecuador* [Tesis de Grado, Universidad Internacional SEK].
<https://repositorio.uisek.edu.ec/bitstream/123456789/4914/1/Maldonado%20Cardona%20Camila%20Alejandra.pdf>

- Michailowsky, V., Luhrs, K., Rocha, M. O. C., Fouts, D., Gazzinelli, R. T., & Manning, J. E. (2003). Humoral and cellular immune responses to Trypanosoma cruzi-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infection and Immunity*, 71(6), 3165–3171. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3165-3171.2003>
- Nguyen, T. T., Motsiri, M. S., Taioe, M. O., Mtshali, M. S., Goto, Y., Kawazu, S. I., Thekisoe, O. M. M., & Inoue, N. (2015). Application of crude and recombinant ELISAs and immunochromatographic test for serodiagnosis of animal trypanosomosis in the Umkhanyakude district of Kwazulu-natal province, south africa. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(2), 217–220. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0330>
- OIE. (2022). *Infección por Trypanosoma Brucei, T. congolense, T. simiae y T. vivax*. Código Sanitario Para Los Animales Terrestres. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/es_chapitre_trypan_brucei_congolense_simiae_vivax.htm
- Ortega-Montalvo, H., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. (2014a, August). First Report and Molecular Identification of Trypanosoma vivax in Cattle from Ecuador. *XIII International Congress of Parasitology (ICOPA XIII)*. https://www.researchgate.net/publication/274006869_First_report_and_molecular_identification_of_Trypanosoma_vivax_in_cattle_from_Ecuador
- Ortega-Montalvo, H., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2014b, May). Primer reporte e identificación molecular de Trypanosoma vivax en bovinos del Ecuador. *IX Congreso de Ciencia y Tecnología*. <https://www.researchgate.net/publication/273808428>
- Osorio Añazco, sebastian A., & Ron Román, J. W. (2022). *Determinación de la prevalencia y factores de riesgo de Tripanosomiasis en explotaciones ganaderas*

(grandes, medianas y pequeñas) de la zona noroccidental de la provincia de Pichincha [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/36548/1/IASA%20I-TIC-0009.pdf>

Otte, E., & Lobo, C. A. (1984). Research needs of Colombia in the light of the activities of the colombo/german project for the intensification of animal disease control.

Preventive Veterinary Medicine, 3(2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90001-1)

Otte, M. J. (1991). *La importancia de la tripanosomiasis en la industria ganadera de Córdoba, (Colombia)*.

Páez, B. P. F. V., & Chávez Larrea, M. A. (2022). *Obtención de la proteína paraflagelar recombinante de Trypanosoma vivax mediante clonación y expresión en Escherichia coli BL21 (DE3)* [Tesis de Grado, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE]. <http://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/32466/1/T-ESPE-052485.pdf>

Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Chandra Sekhar, ; G, & Thomas, R. (2008).

Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmology*, 56(1), 45–50. <https://doi.org/10.4103/0301-4738.37595>

Pillay, D., Izotte, J., Fikru, R., Büscher, P., Mucache, H., Neves, L., Boulangé, A., Seck, M. T., Bouyer, J., Napier, G. B., Chevtzoff, C., Coustou, V., & Baltz, T. (2013).

Trypanosoma vivax GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. *PLoS ONE*, 8(10).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078565>

Reyna-Bello, A., Eleizalde, M. C., & Silva, A. M. (2006). Assessment of chromogen

suitability in ELISA for the detection of anaplasmosis and trypanosomosis. *Journal*

of Immunoassay and Immunochemistry, 28(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1080/15321810601025432>

Ron, K. (2014). *Actualización Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial 2014 - 2019*. <https://info.napo.gob.ec/wp-content/uploads/2022/06/pdotGadmTena.pdf>

Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hottton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. In *Database* (Vol. 2020). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

Seidl, A., Dávila, A. M., & Silva, R. A. (1999). Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94(2), 269–272.

Tavares Marques, L. M., Reyna Bello, A., & Gonzatti, M. I. (2013). *Estudio de las Proteínas Inmunogénicas de Trypanosoma vivax* [Tesis Doctoral]. Universidad Simón Bolívar.

The Sanger Institute. (2011, August 11). *Genome assembly ASM22737v1*. National Center of Biotechnology.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCA_000227375.1/

Tizard, I. R. (2009). *Introducción a la Inmunología veterinaria*. Elsevier .

Uilenberg, G. (1998). *A field guide for The Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomosis*. FAO.

Uzcanga, G. L., Pérez-Rojas, Y., Camargo, R., Izquier, A., Noda, J. A., Chacín, R., Parra, N., Ron, L., Rodríguez-Hidalgo, R., & Bubis, J. (2016). Serodiagnosis of

bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. *Veterinary Parasitology*, 218, 31–42.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.007>

VePathDB Bioinformatics Resource Center. (2020, May 6). *Data Set: Trypanosoma vivax Y486 Genome Sequence and Annotation*. TriTrypDB.

https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/record/dataset/DS_ec7df4510a

Wells, E. A., Betancourt, A., & Ramirez, L. E. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), 448–449.

[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90055-4)

Woo, P. T. K. (1969). The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*, 47(5), 921–923. [https://doi.org/10.1139/z69-](https://doi.org/10.1139/z69-150)

150