



Prevalencia de *Trypanosoma theileri* en bovinos provenientes de zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas

Cueva Villavicencio, Jorge Isaac

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Reyna Bello, Armando Ph.D.

Septiembre 8 del 2021



## Document Information

|                   |   |
|-------------------|---|
| Analyzed document | Jorge Isaac Cueva Villavicencio - ESPE - Biotecnología.pdf (D112235228) |
| Submitted         | 9/8/2021 2:54:00 PM   |
| Submitted by      |   |
| Submitter email   | jicueva@espe.edu.ec   |
| Similarity        | 3%  |
| Analysis address  | us.fannypoza.unia@analysis.orkund.com                                   |

## Sources included in the report

|           |   |  |   |
|-----------|---|--|---|
| <b>W</b>  | URL: <a href="https://docplayer.es/11556549-Clonacion-y-expresion-de-la-proteina-quimera-tv70catl-en-un-sistema-bacteriano.html">https://docplayer.es/11556549-Clonacion-y-expresion-de-la-proteina-quimera-tv70catl-en-un-sistema-bacteriano.html</a><br>Fetched: 5/13/2021 2:05:26 PM |  | 1 |
| <b>SA</b> | <b>Informe Catepsina-Grupo4.docx</b><br>Document Informe Catepsina-Grupo4.docx (D60941910)  |  | 1 |
| <b>SA</b> | <b>TESIS_MICHELL_MEDINA_POZO_11-08-2018 (2).pdf</b><br>Document TESIS_MICHELL_MEDINA_POZO_11-08-2018 (2).pdf (D43893135)  |  | 4 |
| <b>SA</b> | <b>Castillo_Luzuriaga_Vaca_Informe 2_4756.docx</b><br>Document Castillo_Luzuriaga_Vaca_Informe 2_4756.docx (D51389145)  |  | 3 |
| <b>W</b>  | URL: <a href="https://ri.ufmt.br/bitstream/1/1159/1/DISS_2016_Th%C3%A1bata%20dos%20Anjos%20Pacheco.pdf">https://ri.ufmt.br/bitstream/1/1159/1/DISS_2016_Th%C3%A1bata%20dos%20Anjos%20Pacheco.pdf</a><br>Fetched: 9/8/2021 2:55:00 PM  |  | 1 |
| <b>SA</b> | <b>TESIS_MICHELL_MEDINA_POZO_24-08-2018.docx</b><br>Document TESIS_MICHELL_MEDINA_POZO_24-08-2018.docx (D41076750)  |  | 1 |



Firmado electrónicamente por:

ARMANDO

REYNA

Reyna Benío, Armando Ph.D.  
Docente investigador ESPE-ES  
C. C.: 1758891830



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

### CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“Prevalencia de *Trypanosoma theileri* en bovinos provenientes de zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas.”** fue realizado por el señor **Cueva Villavicencio, Jorge Isaac** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, Septiembre 8 del 2021



Firmado electrónicamente por:

**ARMANDO  
REYNA**

---

Reyna Bello, Armando Ph.D.  
Docente investigador ESPE-ES  
C. C.: 1758891830



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo Cueva Villavicencio Jorge Isaac con cédula de ciudadanía n° 1314690940, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **"Prevalencia de *Trypanosoma theileri* en bovinos provenientes de zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas."** 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, Septiembre 8 de 2021

Cueva Villavicencio, Jorge Isaac

C.C.: 1314690940



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Cueva Villavicencio, Jorge Isaac** con cédula de ciudadanía n° **1314690940** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Prevalencia de *Trypanosoma theileri* en bovinos provenientes de zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas.”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, Septiembre 8 de 2021

Cueva Villavicencio, Jorge Isaac

C.C.: 1314690940

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Christian, Isabel, Jorge, Letty y Norberto, mi familia, por todo su apoyo, amor y dedicación a mí durante toda mi vida, por ser mi inspiración y motivación para culminar esta nueva etapa.

También a Karen, quien es mi apoyo y motivación para ser cada día mejor.

## AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por mi familia, abuelos, tíos y primos, quienes han sido el pilar de mi vida y fuente de alegrías, cuyo apoyo fue indispensable durante el inicio, desarrollo y finalización de mis estudios universitarios.

Al Dr. Armando Reyna por la confianza, apoyo, tiempo y guía científica durante el desarrollo de toda la investigación. También por su enseñanza y dedicación como profesor durante la mayor parte de la carrera.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por su colaboración durante el desarrollo de la tesis.

A Agrocalidad por su colaboración y trabajo conjunto durante los muestreos.

Al Dr. Jorge Ron por su colaboración y conocimientos en las salidas de campo.

A la Ing. Cristina Cholota por su apoyo en el laboratorio.

A mis amigos Hugo, Jefferson, Jordan, Kelly y Mateo por su apoyo durante la fase de campo y laboratorio. Además de los buenos momentos vividos durante toda la carrera.

A mis nuevos amigos de la universidad Brandon, Harrison, Jorge, Karen, Katherine, Solange, Sonia y Viviana, por su apoyo durante toda la carrera y los buenos recuerdos vividos.

A mis amigos de toda la vida Alain, Dayana, Ernesto, Fernando, Guillermo y Josué, por seguirme apoyando siempre que lo he necesitado.

## INDICE DE CONTENIDOS

|   |    |
|---|----|
| Carátula .....  | 1  |
| Análisis Urkund.....  | 2  |
| Certificación.....  | 3  |
| Responsabilidad De Autoría .....                                  | 4  |
| Autorización De Publicación .....                                 | 5  |
| Agradecimientos .....   | 7  |
| Indice De Contenidos .....  | 8  |
| Índice De Tablas .....  | 10 |
| Índice De Figuras .....   | 11 |
| Abreviaturas .....  | 12 |
| Resumen .....   | 14 |
| Abstract .....  | 15 |
| Capítulo I: Introducción.....                                     | 16 |
| Formulación del problema.....                                     | 16 |
| Justificación del problema .....                                  | 17 |
| Objetivos de la Investigación .....                               | 19 |
| <i>Objetivo General</i> .....                                     | 19 |
| <i>Objetivo específico</i> .....                                  | 19 |
| Capitulo II: Marco Teórico.....                                   | 20 |
| Generalidades.....  | 20 |
| Clasificación y filogenia de <i>Trypanosoma theileri</i> .....    | 21 |
| Morfología <i>Trypanosoma theileri</i> .....                      | 22 |
| Ciclo biológico y desarrollo de <i>Trypanosoma theileri</i> ..... | 23 |
| Fisiología de <i>Trypanosoma theileri</i> .....                   | 24 |
| Sintomatología de <i>Trypanosoma theileri</i> .....               | 25 |
| Mecanismo de evasión del sistema inmune .....                     | 26 |
| Marcadores moleculares.....                                       | 27 |
| Métodos de diagnóstico.....                                       | 30 |
| <i>Parasitológicos</i> .....                                      | 30 |
| Visualización directa. ....                                       | 30 |
| Prueba Woo.....   | 31 |



|   |    |
|---|----|
| Cultivos de parásitos.....  | 31 |
| <i>Serológicos</i> .....  | 32 |
| <i>Moleculares</i> .....  | 33 |
| Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....  | 33 |
| Hipótesis .....   | 35 |
| Capitulo III: Materiales Y Métodos .....  | 36 |
| Participantes.....  | 36 |
| Fase de campo .....   | 36 |
| <i>Recolección de muestras</i> .....  | 37 |
| Fase de laboratorio .....   | 37 |
| <i>Pruebas parasitológicas</i> .....  | 37 |
| <i>Extracción de ADN a partir de las muestras de sangre</i> .....                                       | 38 |
| <i>Selección del método de diagnóstico apropiado</i> .....  | 39 |
| <i>Diagnóstico de Trypanosoma theileri en los muestreos</i> .....                                       | 44 |
| <i>Caracterización molecular por PCR anidada ITS</i> .....  | 45 |
| Análisis estadístico .....  | 45 |
| Capitulo IV: Resultados Y Discusión.....  | 46 |
| Pruebas parasitológicas .....   | 46 |
| Evaluación de distintas pruebas PCR en muestras identificadas como <i>Trypanosoma theileri</i><br>..... | 48 |
| Identificación y prevalencia de <i>Trypasnosoma theileri</i> mediante PCR - TthCATL .....               | 50 |
| Análisis estadístico .....  | 52 |
| Caracterización molecular de <i>Trypanosoma theileri</i> mediante PCR anidada - ITS.....                | 57 |
| Capítulo V: Conclusiones.....   | 60 |
| Capítulo VI: Recomendaciones .....  | 61 |
| Capítulo VII: Bibliografía .....  | 62 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1</b> Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma theileri</i> .....   | 21 |
| <b>Tabla 2</b> Componentes para 1 litro de medio para cultivo in vitro de <i>Trypanosoma theileri</i> .....                            | 32 |
| <b>Tabla 3</b> Primers usados en la PCR-cdCatL para <i>Trypanosoma spp.</i> .....  | 39 |
| <b>Tabla 4</b> Reactivos utilizados para la PCR-cdCatL.....  | 40 |
| <b>Tabla 5</b> Condiciones de reacción para PCR-cdCatL.....  | 40 |
| <b>Tabla 6</b> Primers usados en la PCR anidada-ITS para <i>Trypanosoma spp.</i> .....   | 41 |
| <b>Tabla 7</b> Reactivos utilizados para la PCR anidada-ITS.....   | 41 |
| <b>Tabla 8</b> Condiciones de reacción para PCR anidada-ITS. ....  | 42 |
| <b>Tabla 9</b> Primers usados en la PCR-TthCATL para <i>Trypanosoma theileri</i> .....   | 43 |
| <b>Tabla 10</b> Reactivos utilizados para la PCR-TthCATL. ....   | 43 |
| <b>Tabla 11</b> Condiciones de reacción para PCR-TthCATL. ....   | 44 |
| <b>Tabla 12</b> Bovinos con anemia en los muestreos.....   | 47 |
| <b>Tabla 13</b> Muestras positivas a Woo en los muestreos. ....  | 47 |
| <b>Tabla 14</b> Muestras positivas a <i>Trypanosoma spp.</i> por frotis en los muestreos. ....   | 48 |
| <b>Tabla 15</b> Muestras positivas a <i>Trypanosoma theileri</i> por PCR - TthCATL en los muestreos.....                               | 52 |
| <b>Tabla 16</b> Prueba T Student para determinar la presencia de anemia en la población positiva...                                    | 54 |
| <b>Tabla 17</b> Prueba de Chi Cuadrado para determinar una asociación entre <i>T. theileri</i> y la anemia.<br>.....                   | 55 |
| <b>Tabla 18</b> Prueba U de Mann-Whitney para determinar si hay diferencia en el hematocrito de la población positiva y negativa. .... | 56 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Tinción en Giemsa de <i>Trypanosoma theileri</i> . .....   | 22 |
| <b>Figura 2</b> Desarrollo de <i>Trypanosoma theileri</i> en los tábanos. ....   | 24 |
| <b>Figura 3</b> Estructura del ADN ribosomal con sus marcadores moleculares.....   | 28 |
| <b>Figura 4</b> Alineamiento aminoacídico de la CatL, se observa los diferentes polimorfismos y<br>secuencias conservadas en los genotipos de <i>Trypanosomas theileri</i> y los demás tripanosomas. 29          |    |
| <b>Figura 5</b> Resultado del PCR – TthCATL en gel de agarosa al 3%. ....  | 49 |
| <b>Figura 6</b> Presencia de anemia y leucocitosis en la población positiva y negativa por PCR TthCATL<br>a <i>T. theileri</i> en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo. .53      |    |
| <b>Figura 7</b> Boxplot de los hematocritos de los 14 animales positivos por PCR TthCATL a <i>T. theileri</i><br>en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo. ....                   | 53 |
| <b>Figura 8</b> Presencia de anemia en la población positiva y negativa por PCR TthCATL a <i>T. theileri</i><br>en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo. ....                    | 54 |
| <b>Figura 9</b> Boxplots de los hematocritos de la población positiva y negativa por PCR TthCATL a <i>T.</i><br><i>theileri</i> en en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo. .... | 55 |
| <b>Figura 10</b> Resultado de la PCR anidada – ITS en gel de agarosa al 1,5%. ....   | 58 |

**ABREVIATURAS**

|              |   |
|--------------|---|
| <b>°C</b>    | Grados centígrados                          |
| <b>ADN</b>   | Ácido desoxirribo nucleico                  |
| <b>ADNr</b>  | ADN ribosomal                               |
| <b>ARN</b>   | Ácido ribo nucleico                         |
| <b>ARNr</b>  | ARN ribosomal                               |
| <b>CatL</b>  | Similar a la catepsina                      |
| <b>dNTP</b>  | Desoxinucleotidos                           |
| <b>EDTA</b>  | Ácido etilendiaminotetraacético             |
| <b>ELISA</b> | Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas |
| <b>fi</b>    | Frecuencia absoluta                         |
| <b>fr</b>    | Frecuencia relativa                         |
| <b>ITS</b>   | Espaciadores internos transcritos           |
| <b>g</b>     | Gramos                                      |
| <b>GL</b>    | Grados de libertad                          |
| <b>L</b>     | Ladder                                      |
| <b>min</b>   | Minutos                                     |
| <b>mg</b>    | Miligramo                                   |

|              |  |
|--------------|--|
| <b>mL</b>    | Mililitro  |
| <b>mM</b>    | Milimolar  |
| <b>MSP</b>   | Proteasa mayor de superficie                           |
| <b>OIE</b>   | Organización Mundial de Sanidad Animal                 |
| <b>P</b>     | Primer   |
| <b>p/v</b>   | Peso sobre volumen                                     |
| <b>pb</b>    | Pares de base  |
| <b>RAPD</b>  | Amplificación aleatoria de ADN polimórfico             |
| <b>PCR</b>   | Reacción en cadena de la polimerasa                    |
| <b>rpm</b>   | Revoluciones por minuto                                |
| <b>TTPSP</b> | Proteínas de superficie putativa de <i>T. theileri</i> |
| <b>U</b>     | Unidades   |
| <b>V</b>     | Voltios  |
| <b>UV</b>    | Ultra violeta  |
| <b>VSG</b>   | Glucoproteína de superficie variante                   |
| <b>μL</b>    | Microlitro   |
| <b>μm</b>    | Micrometro   |
| <b>μM</b>    | Micromolar   |

## RESUMEN

El *Trypanosoma theileri* es un hemoparásito oportunista con amplia distribución global que afecta a bovinos, bufalinos y algunos animales silvestres produciendo infecciones crónicas que en ocasiones presentan síntomas que afectan a la producción pecuaria. En Ecuador hay reportes de *T. theileri* pero no estudios destinados específicamente a su método de diagnóstico eficaz, prevalencia, efecto ni características moleculares. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia y efecto de *T. theileri* en muestreos de diferentes lugares del país, primero por métodos parasitológicos y luego por métodos moleculares, evaluando el método de diagnóstico adecuado para proceder determinar la prevalencia y caracterización molecular. De los métodos de diagnóstico evaluados el más eficaz fue la PCR TthCATL que amplifica de forma parcial la cisteína similar a la catepsina. De los tres muestreos analizados solo se encontró *T. theileri* en el realizado en el camal de Santo Domingo de los Tsáchilas, con una prevalencia del 10.34%. Estadísticamente no se encontraron síntomas que se pudieran relacionar con el parásito. La caracterización molecular realizada por la amplificación de la región ITS dio un fragmento de ~700pb que difiere con otros reportados en África, pero siendo similar a los reportados en Ecuador. Se concluye que la PCR TthCATL es la más efectiva para detectar *T. theileri*, recomendándose para su diagnóstico; que este parásito no producen signos clínicos y que difieren molecularmente de otros reportados, por lo que se recomienda su estudio filogenético.

Palabras Clave:

- **TRYPANOSOMA THEILERI**
- **PCR**
- **ITS**
- **CATEPSINA**

**ABSTRACT**

*Trypanosoma theileri* is an opportunistic haemoparasite with a wide global distribution that affects cattle, buffaloes and some wild animals, producing chronic infections that sometimes present symptoms that affect livestock production. In Ecuador there are reports of *T. theileri* but no studies specifically aimed at its effective diagnostic method, prevalence, effect, or molecular characteristics. The objective of this work was to determine the presence and effect of *T. theileri* in samplings from different parts of the country, first by parasitological methods and then by molecular methods, evaluating the appropriate diagnostic method to proceed to determine the prevalence and molecular characterization. Of the diagnostic methods evaluated, the most efficient was the TthCATL PCR, which partially amplifies cysteine similar to cathepsin. Of the three samplings analyzed, only *T. theileri* was found in the one carried out in the Santo Domingo de los Tsáchilas slaughterhouse, with a prevalence of 10.34%. Statistically, no symptoms were found that could be related to the parasite. The molecular characterization carried out by the amplification of the ITS region gave a fragment of ~700bp that differs from others reported in Africa, but is similar to those reported in Ecuador. It is concluded that the TthCATL PCR is the most effective to detect *T. theileri*, being recommended for its diagnosis; that this parasite does not produce clinical signs and that they differ molecularly from others reported, so its phylogenetic study is recommended.

Key words:

- **TRYPANOSOMA THEILERI**
- **PCR**
- **ITS**
- **CATHEPSIN**

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### Formulación del problema

La tripanosomosis animal es una enfermedad causada por una variedad de hemoparásitos pertenecientes al género *Trypanosoma* divididos en *Stercoraria* y *Salivaria* (Marc Desquesnes, 2004). Estos infectan a varios mamíferos incluyendo al hombre, produciendo fiebre y anemia además de una baja en la productividad en animales domésticos (Gonzatti et al., 2014).

Estos parásitos fueron descritos originalmente en el África subsahariana en donde usan moscas del género *Glossina* como vectores biológicos. En la actualidad se encuentran distribuidos en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, incluyendo Latino América en donde usan moscas picadoras de los géneros *Tabanus* y *Stomoxys* como vectores mecánicos (OIE, 2019). Los tripanosomas de la sección *Stercoraria* se transmiten mediante el contacto de las heces del vector con una herida del animal (Reinhard Böse et al., 1987) y los de la sección *Salivaria* se transmiten mediante la saliva del vector durante la mordedura (Magez et al., 2021). Mientras que la región ya albergaba de forma natural varios tripanosomas de la sección *Stercoraria*, los de la sección *Salivaria* fueron introducidos de forma gradual mediante bovinos y otros animales infectados traídos por los españoles y portugueses durante la conquista, siendo descritos por primera vez en la Guyana Francesa en 1919 (Marc Desquesnes, 2004).

*Trypanosoma theileri* es un tripanosoma del subgénero *Megatrypanum* perteneciente a la sección *Stercoraria* y transmitido mediante tábanos como vector mecánico y cíclico en Latino América (Marc Desquesnes, 2004) y África (Keita et al., 2020), en donde también se ha



encontrado en moscas el género *Glossina* (Garcia et al., 2018); además existen estudios que demuestran a las garrapatas como potencial vector (Morzaria et al., 1986) (Latif et al., 2004). Es considerado un parásito cosmopolita (Marc Desquesnes, 2004) existiendo reportes de bovinos infectados en todo el mundo (Amato et al., 2019) (A. C. Rodrigues et al., 2003) (Villa et al., 2008) (Thompson et al., 2014) (Ybañez et al., 2013) (Seifi, 1995). Este parásito también ha sido reportado en la región como capaz de infectar búfalos (Marc Desquesnes, 2004) (A. C. Rodrigues et al., 2003) (García et al., 2006), además de otros animales salvajes como murciélagos (Jaimes-Dueñez et al., 2020) (Ramírez et al., 2014) y ciervos (Orozco et al., 2020) (Hatama et al., 2007) (Fisher et al., 2013).

En Ecuador existen previos reportes de *T. theileri* en bovinos provenientes de Santo Domingo y Manabí (Rodriguez, 2017) (Cholota et al., 2018), sin embargo, no existen reportes oficiales de *T. theileri* en el país por parte de la OIE, además de no contar con una correcta caracterización de los linajes filogenéticos de la especie ni realizarse pruebas de diagnóstico fiables para determinar la prevalencia en el país.

Con estos antecedentes, la presente tesis busca aplicar pruebas moleculares para la identificación específica de *Trypanosoma theileri* en diferentes zonas del país con previos reportes de enfermedades hemotrópicas, además de caracterizar las muestras positivas con pruebas moleculares para su posterior análisis.

### **Justificación del problema**

A pesar de ser considerado comúnmente como un hemoparásito no patogénico (OIE, 2019) existen casos documentados de tripanosomiasis asociada a *T. theileri* (Seifi, 1995) en donde se puede presentar anemia (WARD et al., 1984) (Hajihassani et al., 2020), linfocitosis

(Cross et al., 1971) y pérdida de peso (Amato et al., 2019). Si bien en estos casos existen otros factores como coinfecciones con otros hemotrópicos (Villa et al., 2008) y malnutrición (Bittner et al., 2021) por lo que algunos autores consideran a *T. theileri* como un patógeno oportunista (Marc Desquesnes, 2004).

El rol de este parásito como patógeno no está del todo claro y su aparente no patogenicidad se puede deber a que por su alta prevalencia los animales se diagnostican en la fase crónica asintomática, pudiendo presentar signos clínicos en animales adultos normalmente no expuestos al parásito (Hajihassani et al., 2020).

La presencia de *Trypanosoma theileri* en Ecuador ya ha sido confirmada en trabajos previos (Rodríguez, 2017) (Cholota et al., 2018) mediante pruebas moleculares genéricas para *Trypanosoma spp.* Sin embargo, en el país no se han realizado pruebas moleculares para el diagnóstico específico de este tripanosoma, existiendo este tipo de pruebas solo para la identificación de *Trypanosoma vivax* (Chávez-Larrea et al., 2021).

Esto es un problema para el diagnóstico de *T. theileri* debido a que su baja parasitemia dificulta su diagnóstico mediante las pruebas parasitológicas (Marc Desquesnes, 2004) requiriéndose de cultivos para poder aislarlos e identificarlos por estas técnicas (Wells et al., 1968). Por otro lado, las técnicas de diagnóstico molecular usando marcadores como las regiones espaciadoras internas transcritas (ITS) y la cisteína similar a la catepsina (CatL) han demostrado ser eficaces para el diagnóstico de *T. theileri* (Cox et al., 2005) (Adriana C. Rodrigues et al., 2010) además de ser útiles para el análisis filogenético (Suganuma et al., 2019). El desarrollo e implementación de estas pruebas en el país es indispensable para establecer la prevalencia de *T. theileri* tanto en el ganado bovino como en la fauna salvaje, y poder caracterizar su linaje filogenético.

## **Objetivos de la Investigación**

### ***Objetivo General***

Determinar la prevalencia de *Trypanosoma theileri* en bovinos provenientes de zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas.

### ***Objetivo específico***

Analizar las muestras sanguíneas por pruebas directas parasitológicas para determinar la prevalencia de *T. theileri*.

Estandarizar las pruebas de PCR para la detección de *T. theileri* en muestras bovinas de campo y de la sala de matanza.

Determinar la prevalencia y caracterizar molecularmente *T. theileri* en los muestreos.

## CAPITULO II:

### MARCO TEÓRICO

#### Generalidades

La tripanosomiasis animal es una enfermedad producida por una variedad de hemoparásitos del género *Trypanosoma* que causan anemia y, dependiendo de especie, afectan en mayor o menor medida a varios mamíferos incluyendo al ser humano. Fue descrita por primera vez en África, pero en la actualidad se encuentra distribuida en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, siendo introducida a América Latina de forma paulatina por españoles y portugueses durante la conquista (Marc Desquesnes, 2004). Debido a la ausencia en la región de las moscas del género *Glossina*, su vector biológico, se adaptaron a las moscas *Tabanus* y *Stomoxys* como vector mecánico (OIE, 2019).

El género *Trypanosoma* se divide en varios sub géneros agrupados en dos secciones, *Stercoraria* y *Salivaria*, dependiendo de si la transmisión se da mediante el contacto de las heces del vector con una herida del animal (Reinhard Böse et al., 1987) o mediante la saliva del vector durante la picadura (Magez et al., 2021), respectivamente. Las especies *Trypanosoma vivax* (sub género *Duttonella*), *Trypanosoma evansi* (sub género *Trypanozoon*) y *Trypanosoma equiperdum* (sub género *Trypanozoon*) pertenecen a la sección *Salivaria*, mientras que *Trypanosoma cruzi* (sub género *Schizotrypanum*), *Trypanosoma ingens* (sub género *Megatrypanum*) y *Trypanosoma theileri* (sub género *Megatrypanum*) a la sección *Stercolaria* (Marc Desquesnes, 2004).

La tripanosomiasis afecta a animales silvestres y domésticos, infectando las especies *T. vivax*, *T. evansi* y *T. cruzi* a bovinos, ovinos y equinos, *T. equiperdum* a caballos, *T. ingens* a bovinos y *T. cruzi* a humanos (Marc Desquesnes, 2004). El *T. theileri* afecta principalmente a

bovinos y búfalos, existiendo reportes también en ciervos (Orozco et al., 2020) y murciélagos silvestres (Jaimes-Dueñez et al., 2020). Todas estas especies son de importancia económica debido a que afectan a la producción pecuaria (Dávila & Silva, 2000).

### **Clasificación y filogenia de *Trypanosoma theileri***

El *T. theileri* es un protozoo que pertenece al sub género *Megatrypanum* y a la sección *Stercoraria*. Junto a los demás miembros del género *Trypanosoma* se encuentran en la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida* y filo *Sarcomastigophora* (Marc Desquesnes, 2004). La taxonomía de *T. theileri* se explica detalladamente en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de Trypanosoma theileri.*

|                   |                          |
|-------------------|--------------------------|
| <b>Dominio</b>    | <i>Eukaryota</i>         |
| <b>Subreino</b>   | <i>Protozoa</i>          |
| <b>Filo</b>       | <i>Sarcomastigophora</i> |
| <b>Subfilo</b>    | <i>Mastigophora</i>      |
| <b>Clase</b>      | <i>Zoomastigophorea</i>  |
| <b>Orden</b>      | <i>Kinetoplastida</i>    |
| <b>Sub orden</b>  | <i>Trypanosomatina</i>   |
| <b>Familia</b>    | <i>Trypanosomatidae</i>  |
| <b>Género</b>     | <i>Trypanosoma</i>       |
| <b>Sub género</b> | <i>Megatrypanum</i>      |
| <b>Especie</b>    | <i>T. (M.) theileri</i>  |

**Nota:** Obtenido de (Marc Desquesnes, 2004).

Dentro de los *T. theileri* existen varios genotipos que se agrupan principalmente en dos linajes filogenéticos con fuerte divergencia entre ellos, el TthI y TthII (A. C. Rodrigues et al.,

2010). Dentro del linaje TthI se han reportado tres genotipos IA, IB y IC, mientras que en el linaje TthII se reportan seis que corresponden a los genotipos IIA, IIB, IIC, IID, IIE y IIF (Suganuma et al., 2019). En algunos lugares se han reportado la presencia alto polimorfismo sugiriendo la posibilidad de otros genotipos no estudiados (Garcia, Kamyngkird, et al., 2011).

### **Morfología *Trypanosoma theileri***

Es un parásito unicelular flagelado que se distingue de los demás tripanosomas por su gran tamaño, con una longitud de 69 – 109  $\mu\text{m}$ , ancho de 1.4 – 5  $\mu\text{m}$  y un flagelo libre de 4 – 26  $\mu\text{m}$ . Posee una membrana ondulante bien desarrollada y su parte trasera es rígida con forma de punta. Su kinetoplasto tiene un tamaño de 1.1  $\mu\text{m}$  y se encuentra ubicado lejos de la porción trasera cónica del parásito, tiene un alto índice de kinetoplasto es de 2.5 – 5.8 y un índice nuclear un poco mayor de 1 (Marc Desquesnes, 2004).

### **Figura 1**

*Tinción en Giemsa de Trypanosoma theileri.*



**Nota:** Recuperado de (Suganuma et al., 2019).

### **Ciclo biológico y desarrollo de *Trypanosoma theileri***

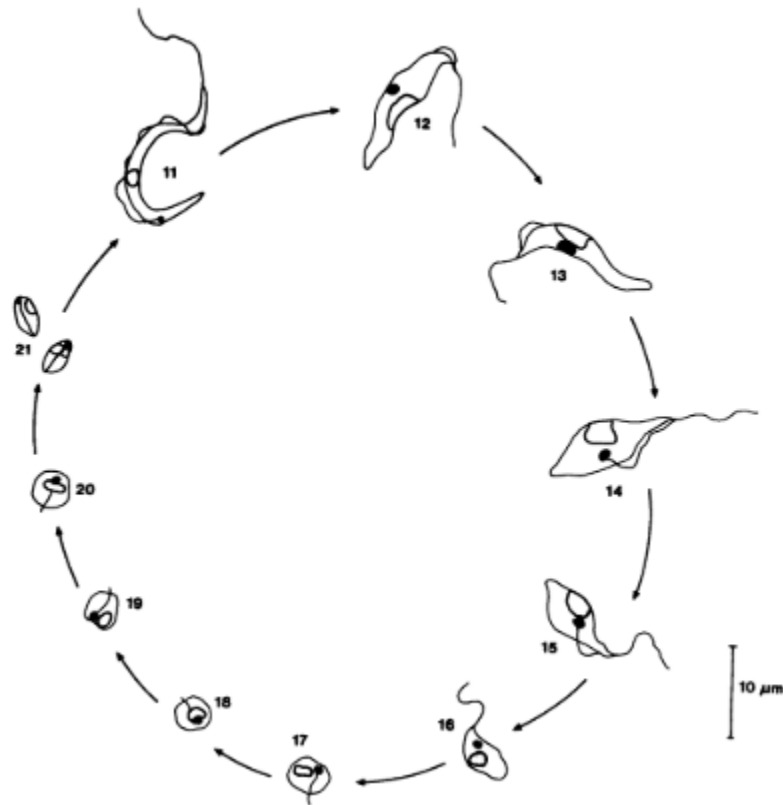
Se puede transmitir de forma mecánica, cíclica, transplacentaria e iatrogénica, aunque por su generalmente baja parasitemia la transmisión puramente mecánica e iatrogénica es complicada pero no imposible (Marc Desquesnes, 2004). El principal vector de *T. theileri* son las moscas de la familia *Tabanidae* (R. Böse et al., 1987), pero también se ha encontrado en moscas del género *Glossina* (García et al., 2018), garrapatas (Latif et al., 2004) y murciélagos (Jaimes-Dueñez et al., 2020). La gran distribución del tábano en el mundo (Coscarón & Papavero, 2009) contribuye a la prevalencia y carácter cosmopolita del *T. theileri*.

La transmisión cíclica del *T. theileri* dentro de los tábanos se da primero con las formas adultas de trypomastigotes que se encuentran en la sangre del bovino transformándose a epimastigotes en el intestino medio del tábano, estas realizan fisión binaria para dar lugar a las formas intermedias de trypomastigotes que luego se transforman en metatrypanosomas, la forma infectiva encontrada en los intestinos y heces de los tábanos (Marc Desquesnes, 2004) (Reinhard Böse & Heister, 1993). La transmisión al bovino se da por contacto de las heces con las heridas causadas por el tábano o la mucosa oral (R. Böse et al., 1987).

Existe poca información del desarrollo de *T. theileri* dentro del hospedero, conociéndose principalmente la existencia epimastigotes y trypomastigotes en sangre periférica. La existencia de una fase intracelular en los amastigotes se ha confirmado mediante cultivos celulares, mostrando capacidad de infectar tanto células fagocitarias como no fagocitarias (Lee et al., 2013).

**Figura 2**

*Desarrollo de Trypanosoma theileri en los tábanos.*



**Nota:** 11. Trypomastigote en sangre bovina. 12-14. Fases de epimastigote en el intestino medio del tábano del primer al tercer día después de la infección. 15. Epimastigote en el intestino medio y grueso al cuarto día. 16. Fase de epimastigote en el intestino grueso al quinto día. 17-21. Fases meta cíclicas del sexto al décimo día. 21. División. Recuperado de (Reinhard Böse & Heister, 1993).

### **Fisiología de *Trypanosoma theileri***

El metabolismo energético de *T. theileri* consiste en la degradación de carbohidratos por glicolisis con acetato y succinato como productos finales, y presenta una cadena respiratoria con



citocromos, además carece de una catabolismo de aminoácidos para producción de energía (Van Hellemond et al., 2007).

Estudios en el genoma de *T. theileri* realizados por (Kelly et al., 2017) encontraron genes que permiten inferir características fisiológicas:

- Familias de genes codificadores de invertasas predichas a anclarse en la superficie celular, por lo que se cree que pueda degradar la sacarosa del medio para obtener glucosa.
- Genes de proteínas AGO 1, DCL1, DCL2, RIF4 y RIF5, que indican la presencia de silenciamiento de genes por ARN interferente (ARNi).
- Genes AMPK, proteínas quinasas YAK, proteína fosfatasa 1 y un ortólogo de la proteína de unión al ARN TbRBP7, lo que podría indicar crecimiento dependiente a la densidad o capacidad de quiescencia celular.
- Genes SPO11, MND1, HOP1 y DMC1 exclusivos y necesarios para la meiosis por lo que realizaría intercambio meiótico.

### **Sintomatología de *Trypanosoma theileri***

El *T. theileri* es generalmente considerado como un parásito no patogénico (OIE, 2019) o como un parásito oportunista en presencia de otros microorganismos incluyendo otras especies de tripanosomas (Villa et al., 2008) (Marc Desquesnes, 2004), siendo también relacionado a casos de malnutrición con deficiencia de nutrientes (Bittner et al., 2021). Debido a esto puede estar presente en el bovino de forma crónica y asintomática, lo que junto a su baja parasitemia dificulta su detección y facilita su diseminación.

Sin embargo, existen reportes de tripanosomiasis con signos clínicos causada exclusivamente por *T. theileri*, en los que se ha descrito leucocitosis (Cross et al., 1971), anemia, fiebre y pérdida de peso (Hajihassani et al., 2020) (Seifi, 1995) (Bittner et al., 2021), y una presencia del parásito en médula ósea, cerebro, ganglios linfáticos pulmonares, bazo, testículo (Amato et al., 2019) y líquido peritoneal (Sood et al., 2011). Otros estudios han relacionado la tripanosomiasis causada por *T. theileri* con una baja de producción en vacas lecheras y muerte fetal (WARD et al., 1984). Estos reportes de bovinos con signos clínicos asociado a *T. theileri* podría indicar que su rol como patógeno aún no se encuentra del todo claro y debe ser más estudiado.

### **Mecanismo de evasión del sistema inmune**

Las infecciones crónicas causadas por tripanosomas indican que estos poseen algún mecanismo para evitar al sistema inmune. A diferencia de otros tripanosomas se desconoce el mecanismo utilizado por *T. theileri* para evadir la respuesta inmunitaria. Estudios genómicos y transcriptómicos realizados por (Kelly et al., 2017) encontraron que *T. theileri* carece de los genes de la glucoproteína de superficie variante (VSG) que es principal mecanismo de evasión antigénica usado por los tripanosomas africanos (Schwede & Carrington, 2010), además de contener pocas copias de amastinas y de proteasas de superficie mayor (MSP) que son características de *Leishmania sp.* (Urban et al., 2011).

(Kelly et al., 2017) encontraron en *T. theileri* cuatro nuevos grandes ortogrupos de genes denominados proteínas de superficie putativa de *T. theileri* (TTPSP) que codifican polipéptidos con secuencias de señales N-terminales putativas conservadas y de sitios C-terminales para anclaje por glicosilfosfatidilinositol (GPI). Se especula la posibilidad de que las TTPSP se

relacionen con proteínas similares a las mucinas de *T. cruzi* (Urban et al., 2011) y que formen junto a las MSP una capa densamente empaquetada que permita degradar inmunoglobulinas y componentes del complemento, lo que permitiría eludir el reconocimiento inmunitario (Kelly et al., 2017).

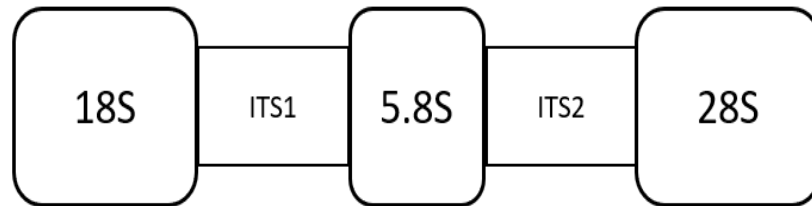
### **Marcadores moleculares**

Dentro del género *Trypanosoma* existen varios marcadores moleculares que se han utilizado para su identificación, caracterización y análisis filogenético. Los principales marcadores moleculares son las secuencias que conforman el ADN ribosómico (ADNr) y el gen que codifica a la enzima similar a la catepsina (CatL), siendo estos los más usados para el diagnóstico y caracterización molecular en *T. theileri*.

Las secuencias del ADNr fueron de las primeras utilizadas como marcadores moleculares en el estudio de los tripanosomas, esto debido a su alto número de copias. El ADNr consta de las secuencias 18S del ARN ribosomal (ARNr) que conforma la subunidad ribosomal pequeña (SSU), la 5.8S y 28S del ARNr que forman parte de la subunidad ribosomal grande (LSU) y dos espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) (Hernandez et al., 1993). El ITS1 fue el primer marcador utilizado para la identificación molecular de *T. theileri* (M Desquesnes et al., 2001), mientras que los marcadores 18S e ITS1 fueron los primeros utilizados para su análisis filogenético, en donde se evidenció la presencia de varios linajes dentro de la especie (A. C. Rodrigues et al., 2006). Los marcadores ITS1, 5.8S e ITS2 también se utilizan en conjunto, lo que también se conoce como la región ITS completa, siendo empleados tanto en identificación molecular (Cox et al., 2005) como en análisis filogenéticos (Suganuma et al., 2019).

**Figura 3**

Estructura del ADN ribosomal con sus marcadores moleculares.

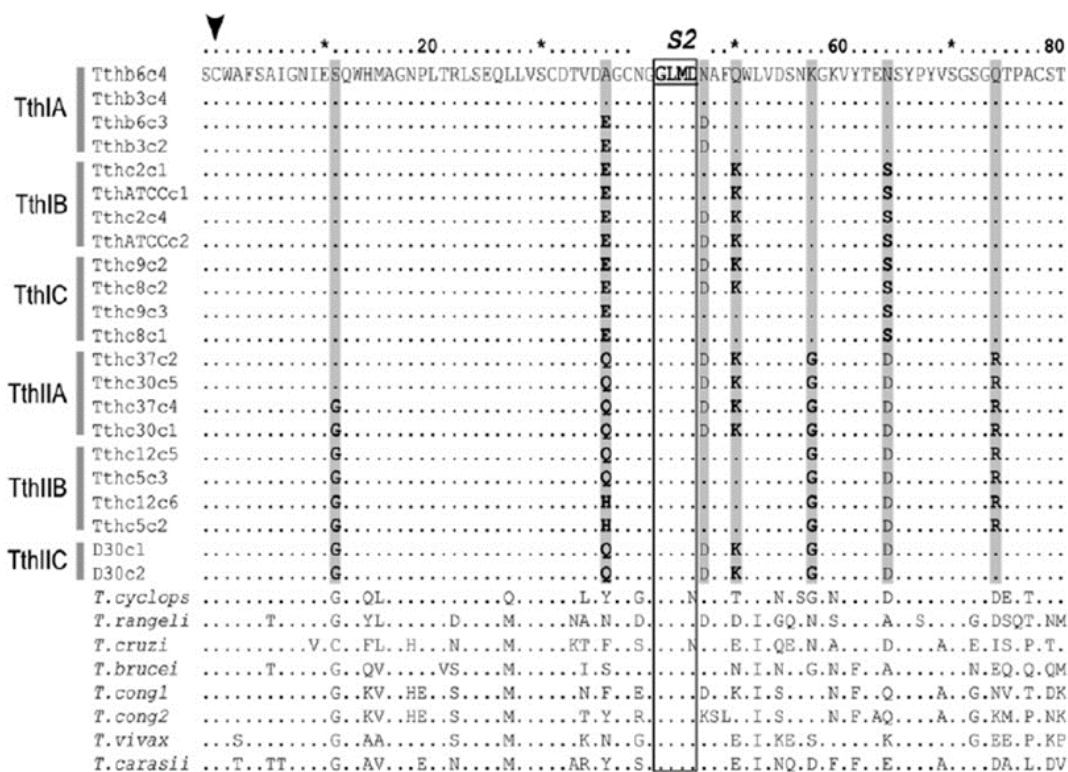


**Nota:** Según (Cox et al., 2005).

La CatL son cisteína proteasas indispensables para la supervivencia y desarrollo de los tripanosomas, siendo necesarias para la infectividad, hidrólisis de proteínas y evasión de la respuesta inmunitaria (Siqueira-Neto et al., 2018). Existen múltiples copias de los genes CatL dentro de los tripanosomas, donde dependiendo de la especie se organizados en largos arreglos en tándem o en cúmulos localizados en varios cromosomas (Caffrey & Steverding, 2009). El dominio catalítico de la CatL es el principal blanco como marcador molecular, esto debido a que está ligado a su funcionamiento y estructura razón por la cual es una secuencia conservada (Berti & Storer, 1995). Esto junto a su alto número de copias hacen de la CatL un marcador molecular ideal para la identificación y análisis filogenético de los tripanosomas, incluido el *T. theileri* donde se ha utilizado para caracterizar los diferentes genotipos (Adriana C. Rodrigues et al., 2010) (Suganuma et al., 2019).

Figura 4

Alineamiento aminoacídico de la *CatL*, se observa los diferentes polimorfismos y secuencias conservadas en los genotipos de *Trypanosomas theileri* y los demás tripanosomas.



**Nota:** Recuperado de (Adriana C. Rodrigues et al., 2010).

Finalmente está el marcador molecular *Tth625*, que es un amplicón de 500pb obtenido por (A. C. Rodrigues et al., 2003) mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico para la identificación de *T. theileri* y que también se utiliza para su caracterización molecular (Suganuma et al., 2019).

Otros marcadores moleculares incluyen el líder de empalme (SL) o mini exón (A. C. Rodrigues et al., 2010) usado al principio para la identificación de tripanosomas (Gibson et al., 2000), los genes de la proteína de shock térmico de (hsp70) (Fraga et al., 2016), del citocromo b

(Garcia, Rodrigues, et al., 2011) y del gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa glicosomal (gGAPDH) (Pacheco et al., 2018), que se utilizan en estudios de diversidad genética.

### **Métodos de diagnóstico**

El diagnóstico clínico de la tripanosomiasis animal es complicado debido a que sus síntomas se asemejan a los provocados por varios hemotrópicos u otras enfermedades, razón por la cual las pruebas de diagnóstico son necesarias para confirmar cualquier sospecha (Marc Desquesnes, 2004). Esto tiene especial importancia en el caso de *Trypanosoma theileri* debido a que generalmente no presenta sintomatología. Existen varias pruebas de diagnóstico con diferente sensibilidad, especificidad, coste y aplicabilidad, debiéndose escoger la prueba de acuerdo a las necesidades (OIE, 2019).

### **Parasitológicos**

Durante mucho tiempo fueron consideradas el “*Gold Standar*” para la identificación de tripanosomas, permitiendo diferenciar entre varias especies por su morfología, sin embargo presentan problemas de sensibilidad (H. K. Auty et al., 2015). El *T. theileri* es especialmente difícil de identificar debido a su baja sensibilidad (Marc Desquesnes, 2004), sin embargo es fácil de diferenciar de otras especies de tripanosoma por su tamaño (OIE, 2019).

**Visualización directa.** Consiste en la visualización de una muestra de material biológico en microscopio, siendo la más común sangre que se debe observar fresca con un tiempo máximo de 4 horas. Se pueden usar frotis sanguíneos fijados con etanol y teñidos con Giemsa para ser visualizados en microscopios a 1000 X (Marc Desquesnes, 2004).

Existen técnicas de concentración de parásitos que mejoran la sensibilidad de la visualización directa (OIE, 2019).

**Prueba Woo.** Es una técnica de concentración de parásitos que consiste en la centrifugación de un microcapilar con sangre para separar sus diferentes componentes. Los tripanosomas quedan concentrado en la capa leucocítica del hematocrito, que se encuentra entre el plasma y los glóbulos rojos, lo que facilita su visualización en un microscopio (Woo, 1970).

El microcapilar se puede cortar para visualizar la capa leucocítica sobre un porta objetos en un microscopio de campo oscuro, lo que facilita visualizar el tripanosoma (OIE, 2019).

**Cultivos de parásitos.** Existen varios protocolos para el cultivo *in vitro* de tripanosomas, con resultados irregulares dependiendo de la especie (Marc Desquesnes, 2004). Sin embargo, el cultivo *in vitro* ha demostrado ser exitoso para el diagnóstico de *T. theileri* (Wells, 1971), siendo una solución a su baja parasitema y mostrando una sensibilidad de hasta el 100% (Marc Desquesnes, 2004). Debido a la necesidad de equipamiento específico, tiempo de cultivo y uso de un kit de purificación, el cultivo *in vitro* no se recomienda para el diagnóstico de tripanosomas en general (OIE, 2019).

El cultivo *in vitro* de *T. theileri* se puede realizar tanto solo en medio de cultivo (Wells et al., 1968) como en un co-cultivo celular de riñón bovino Madin – Darby (MDBK) (Suganuma et al., 2019).

**Tabla 2**

*Componentes para 1 litro de medio para cultivo in vitro de Trypanosoma theileri.*

| <b>Reactivo</b>     | <b>Cantidad</b> |
|---------------------|-----------------|
| Base de agar sangre | 32 g            |
| Dextrosa            | 1.5 g           |
| Agua destilada      | 800 mL          |
| Sangre de caballo   | 200 mL          |

**Nota:** Recuperado de (Wells et al., 1968)

### ***Serológicos***

Estas pruebas se basan en la detección de la respuesta inmunitaria al tripanosoma, siendo las principales pruebas la inmunofluorescencia indirecta y ELISA para la detección de anticuerpos (OIE, 2019). Debido a que la parasitemia de los tripanosomas varía, el uso de las pruebas serológicas se presenta como una herramienta útil (H. K. Auty et al., 2015) y aunque no son capaces de diferenciar si la infección está activa o tomó lugar en el pasado, son importantes para estudios epidemiológicos y cálculo de la prevalencia (Marc Desquesnes, 2004).

Dentro de los principales antígenos utilizados para la detección de tripanosomas se encuentra la VSG debido a su alta inmunogenicidad y expresión, pero su aplicabilidad como herramienta de diagnóstico es limitada por su variabilidad (H. K. Auty et al., 2015) y ausencia en ciertos tripanosomas, como es en el caso de *T. theileri*.

La mayoría de las pruebas de ELISA se han desarrollado para la detección de los tripanosomas considerados como patogénicos, razón por la cual no detectan a *T. theileri* teniendo una alta especificidad para esto (Marc Desquesnes, 2004). Sin embargo, si se han



desarrollado pruebas ELISA para el diagnóstico específico de *T. theileri*, pero con resultados mixtos (Townsend et al., 1982).

### **Moleculares**

Estas pruebas se basan en la detección del ADN del parásito, usando para esto principalmente los marcadores moleculares al permitir una identificación específica. Los principales marcadores moleculares utilizados para el diagnóstico de tripanosomas son el 18S, ITS1 y CatL (M. Desquesnes & Dávila, 2002) (Lima et al., 1994). Las principales pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico de tripanosomas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) (M. Desquesnes & Dávila, 2002). La prueba más utilizada es la PCR por su alta sensibilidad y especificidad (Marc Desquesnes, 2004), sin embargo, presenta la desventaja de requerir equipo especializado y no poder ser realizado en campo (Magez & Radwanska, 2009). Las pruebas de amplificación *in situ* térmica mediada por bucle (LAMP) se presentan como una alternativa eficiente para el diagnóstico molecular en campo (H. K. Auty et al., 2015).

**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Esta prueba consiste la amplificación específica de un fragmento de ADN, requiriendo para esto una mezcla de ADN, Taq polimerasa, ácidos de fosfato desoxirribonucleico (dNTP), un buffer de reacción y uno o más pares de oligonucleótidos (primers) que flanquean el fragmento a amplificar. La mezcla se somete a tres ciclos térmicos (Marc Desquesnes, 2004):

- **Desnaturalización:** Se usa una temperatura alta para separar las hebras de ADN presentes en la mezcla.
- **Hibridación:** Se usa una temperatura específica de acuerdo al primer para que se una a las hebras de ADN.

- Extensión: Se usa la temperatura de funcionamiento de la Taq polimerasa para polimerizar el fragmento dentro del par de primers.

El tamaño del fragmento obtenido se comprueba mediante una electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y se observan bajo luz UV, sin embargo, el tamaño de los fragmentos no siempre es fiable (OIE, 2019).

Una variación de la prueba PCR convencional es la PCR anidada, esta consiste en dos reacciones, en la primera se usa un par de primers externos al marcador molecular, mientras que en la segunda se usan los primers que amplifican el fragmento deseado. Esta prueba se usa cuando existen problemas de especificidad con los primers y puede mejorar la sensibilidad del diagnóstico (M. Desquesnes & Dávila, 2002).

A pesar de su alta sensibilidad, es posible obtener falsos negativos con pruebas PCR cuando la parasitemia en sangre es menor a un tripanosoma por mL o si los primers utilizados son muy específicos, lo que evita la detección de ciertas cepas que tienen variación en sus marcadores moleculares (OIE, 2019).

Existen varias pruebas PCR para el diagnóstico específico de *T. theileri*.

- Tth625-PCR (A. C. Rodrigues et al., 2003): Es una prueba de PCR convencional que utiliza los primers Tth625a y Tth625b, obteniendo un amplicón de 500pb. Esta prueba se desarrolló a partir de una prueba RAPD que mostraba especificidad para el diagnóstico de *T. theileri*, tanto para los tripanosomas de ganado bovino como bufalino.
- ITS anidado (Cox et al., 2005): Es una prueba de PCR anidada que utiliza dos pares de primers que amplifican la región ITS, a pesar de amplificar varias especies de tripanosomas, permite diferenciar a *T. theileri* al presentar un amplicón de ~900 pb.

Esta prueba tiene como marcador molecular la región completa ITS, siendo los primers externos complementarios a 18S y 28S, mientras que los internos amplifican los marcadores ITS1, 5.8S e ITS2.

- PCR-TthCATL (Adriana C. Rodrigues et al., 2010): Es una prueba de PCR convencional que utiliza los primers TthCATL1 y DTO155, obteniendo un amplicón de ~273 pb. Esta prueba tiene como marcador molecular el gen de CatL, desarrollándose a partir del PCR genérico para tripanosoma que amplifica los dominios catalíticos parciales de CatL usando los primers DTO 154 y DTO 155 (Lima et al., 1994). El primer TthCATL1 se desarrolló para amplificar de forma selectiva a *T. theileri* usando secuencia en la CatL que no se encuentran en los demás tripanosomas.

### Hipótesis

Las pruebas moleculares PCR permiten un diagnóstico específico de *Trypanosoma theileri* en las zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas.

### CAPITULO III:

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### **Participantes**

El presente proyecto de investigación fue realizado con el apoyo del grupo de investigación BruTryp financiado por del ARES de Bélgica, el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE Sede Santo Domingo y el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. Contó también con el apoyo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario Agrocalidad.

La investigación fue realizada por el señor Jorge Isaac Cueva Villavicencio, con el asesoramiento científico y técnico del Dr. Armando Reyna Ph.D, docente investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE Sede Santo Domingo, Dr. Jorge Ron Ph.D, docente investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE IASA I, y la Ing. Cristina Cholota, técnico del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

##### **Fase de campo**

Durante los meses de Febrero y Marzo se recolectaron un total de 135 muestras de ganado bovino en el camal EP Mancomunada Trópico Húmedo, cantón Santo Domingo, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas. En el mes de Junio se realizó otro muestreo en varias fincas de la parroquia Chontapunta, cantón Tena, provincia de Napo, debido a un reporte de *Trypanosoma spp.* por parte de Agrocalidad, obteniéndose 46 muestras. Finalmente 26 muestras recolectadas el mismo mes en la parroquia Tonchinque, cantón Atacames, provincia

de Esmeraldas, fueron proporcionadas por Agrocalidad para realizar el diagnóstico debido a sospecha de hemotrópicos en los animales.

### ***Recolección de muestras***

Las muestras de sangre bovina en los predios ganaderos se recolectaron en tubos de EDTA mediante punción de la vena coccígea llenando un aproximado del 70% del tubo. Se revisó previamente la temperatura del animal y otros síntomas de enfermedades hemotrópicas. Las muestras del camal se recolectaron directamente del animal sacrificado.

### **Fase de laboratorio**

Del total de 207 muestras, a 181 provenientes de los muestreos de Santo Domingo y el Tena se le realizaron pruebas parasitológicas para determinar la presencia de *Trypanosoma spp.* A las muestras proporcionas por Agrocalidad no se le realizaron pruebas parasitológicas.

### ***Pruebas parasitológicas***

Se realizó una prueba de hematocrito para determinar la presencia de anemia en los animales centrifugando un microcapilar con aproximadamente 75 uL de sangre fresca a 13 000 rpm por 3 minutos. Posteriormente se realizó una prueba de Woo visualizando la capa leucocítica del microcapilar en un microscopio con aumento de 20X para identificar la presencia de *Trypanosoma spp.* en la muestra de sangre (Woo, 1970). Finalmente se realizó un frotis sanguíneo y tinción con Giensa con 5 uL de muestra para permitir la visualización en el microscopio de las células y de las estructuras de *Trypanosoma spp.* en la muestra de sangre (Marc Desquesnes, 2004). La cuantificación de los leucocitos en el campo visual se realizó para determinar la presencia de leucitosis en las muestras, además de comprobarse la presencia de otros hemotrópicos.

### ***Extracción de ADN a partir de las muestras de sangre***

La extracción se realizó mediante un método casero de *salting – out* descrito por (Riera et al., 2010).

Procedimiento de extracción de ADN a partir de sangre completa:

1. 500 uL de sangre completa.
2. 540 uL de Buffer GR.
3. Centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm y descartar sobrenadante.
  - a. Repetir los pasos 2 y 3 dos veces.
4. 80 uL de Buffer GB.
5. 20 uL de proteinasa K (20mg/mL).
6. 6 uL de SDS al 20% y homogenizar.
7. Incubar por 2 horas a 57 °C con agitación a 1000 rpm (agitación opcional).
8. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
9. 50 uL de acetato de potasio 3M y homogenizar.
10. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y trasvasar el sobrenadante
  - a. Repetir los pasos 9 y 10.
11. 600 uL de etanol absoluto a -20°C e incubar por 20 minutos a -20°C.
12. Se puede dejar la muestra *over night*.
13. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
14. Lavar el pellet con 100 uL de etanol al 70%.
15. Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y descartar sobrenadante.
16. Dejar secar a 37 °C.
17. Resuspender en 50 uL de Buffer TE.
18. Almacenar en congelación a -20°C.

La calidad del ADN extraído se evaluó en una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v) con bromuro de etidio, corridos a 100 V durante 45 minutos.

### ***Selección del método de diagnóstico apropiado***

Las muestras consideradas como sospechosas a *T. theileri* mediante pruebas parasitológicas fueron evaluadas con diferentes protocolos de PCR reportados como capaces de amplificar *T. theileri*.

Los protocolos evaluados fueron:

Amplificación específica de género por PCR convencional de la secuencia correspondiente al dominio catalítico parcial de la cisteína similar a catepsina (PCR-cdCatL) (Lima et al., 1994), reportado por (Adriana C. Rodrigues et al., 2010) como capaz de amplificar *T. theileri*. Se utilizó como control positivo un plásmido con la secuencia del dominio catalítico parcial de *T. vivax*, donado por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

### **Tabla 3**

*Primers usados en la PCR-cdCatL para Trypanosoma spp.*

| <b>Primer</b> | <b>Secuencia</b>                                      |
|---------------|---|
| DTO154        | 5' - ACA GAA TTC CAG GGC CAA TGC GGC TCG TGC TGG - 3' |
| DTO155        | 5' - TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT CCA GTA - 3'     |

**Nota:** Recuperado de (Cortez et al., 2009)

**Tabla 4***Reactivos utilizados para la PCR-cdCatL.*

| Reactivos       | Stock    | Concentración final | Volumen  |
|-----------------|----------|---------------------|----------|
| <b>H2O</b>      | N/A      | -                   | 18.30 uL |
| <b>Buffer</b>   | 10 X     | 1 X                 | 2.50 uL  |
| <b>P DTO154</b> | 10 uM/uL | 0.50 uM/uL          | 1.25 uL  |
| <b>P DTO155</b> | 10 uM/uL | 0.50 uM/uL          | 1.25 uL  |
| <b>MgCl2</b>    | 20 mM/uL | 2 mM/uL             | -        |
| <b>dNTP</b>     | 10 uM/uL | 0.2 uM/uL           | 0.50 uL  |
| <b>Taq</b>      | 5 U/uL   | 1 U                 | 0.20 uL  |
| <b>ADN</b>      | -        | -                   | 1 uL     |
| <b>Total</b>    |          |                     | 25 uL    |

**Nota:** **P:** Primer; **MgCl2:** Cloruro de magnesio; **dNTP:** Desoxinucleotidos; **Taq:** Taq Polimerasa;

**uM:** Micromolar; **uL:** mMcrolitro; **mM:** Milimolar; **U:** Unidades.

**Tabla 5***Condiciones de reacción para PCR-cdCatL.*

| Ciclo | Proceso                   | Temperatura | Tiempo  |
|-------|---------------------------|-------------|---------|
| 1     | Desnaturalización inicial | 94 °C       | 5 min   |
|       | Desnaturalización         | 94 °C       | 0.5 min |
| 35    | Hibridación               | 62 °C       | 0.5 min |
|       | Extensión                 | 72 °C       | 1 min   |
| 1     | Extensión final           | 72 °C       | 10 min  |
| -     | Mantenimiento             | 20 °C       | -       |

**Nota:** °C: Grados centígrados; **min:** Minutos. Según (Cortez et al., 2009).

Los productos de la PCR-cdCatL se observaron en un gel de agarosa al 2% (p/v) con bromuro de etidio, corrido a 100V durante 45 minutos.



Amplificación específica de género por PCR anidado de la secuencia completa de ITS (PCR anidada-ITS), reportado por (Cox et al., 2005) como capaz de identificar *T. theileri* por el tamaño del amplicón. Se utilizó como control positivo un plásmido con la secuencia de la región ITS completada de *T. evansi*, donado por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

**Tabla 6**

*Primers usados en la PCR anidada-ITS para Trypanosoma spp.*

| Primer | Secuencia                               |
|--------|---|
| ITS 1  | 5' - GAT TAC GTC CCT GCC ATT TG - 3'    |
| ITS 2  | 5' - TTG TTC GCT ATC GGT CTT - 3'       |
| ITS 3  | 5' - GGA AGC AAA AGT CGT AAC AAG G - 3' |
| ITS 4  | 5' - TGT TTT CTT TTC CTC CGC TG - 3'    |

**Nota:** Recuperado de (Cox et al., 2005).

**Tabla 7**

*Reactivos utilizados para la PCR anidada-ITS.*

| Reactivos    | Stock    | Concentración final | Volumen      |
|--------------|----------|---------------------|--------------|
| H2O          | N/A      | -                   | 15.75 uL     |
| Buffer       | 10 X     | 1 X                 | 2.50 uL      |
| P ITS 1/3    | 10 uM/uL | 1 uM/uL             | 2.50 uL      |
| P ITS 2/4    | 10 uM/uL | 1 uM/uL             | 2.50 uL      |
| MgCl2        | 20 mM/uL | 2 mM/uL             | -            |
| dNTP         | 10 uM/uL | 0.2 uM/uL           | 0.50 uL      |
| Taq          | 5 U/uL   | 1,25 U              | 0.25 uL      |
| ADN          | -        | -                   | 1 uL         |
| <b>Total</b> |          |                     | <b>25 uL</b> |

**Nota:** **P:** Primer; **MgCl<sub>2</sub>:** Cloruro de magnesio; **dNTP:** Desoxinucleotidos; **Taq:** Taq Polimerasa;

**uM:** Micromolar; **uL:** mMcrolitro; **mM:** Milimolar; **U:** Unidades.

**Tabla 8**

*Condiciones de reacción para PCR anidada-ITS.*

| Ciclo | Proceso                   | Temperatura | Tiempo |
|-------|---------------------------|-------------|--------|
| 1     | Desnaturalización inicial | 95 °C       | 7 min  |
|       | Desnaturalización         | 94 °C       | 1 min  |
| 35    | Hibridación               | 55 °C       | 1 min  |
|       | Extensión                 | 72 °C       | 2 min  |
| 1     | Extensión final           | 72 °C       | 10 min |
| -     | Mantenimiento             | 4 °C        | -      |

**Nota:** °C: Grados centígrados; min: Minutos. Recuperado de (Cox et al., 2005).

Los productos de la PCR anidada-ITS se observaron en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) con bromuro de etidio, corrido a 100V durante 45 minutos.

Amplificación específica de especie por PCR convencional de la secuencia correspondiente a la cisteína similar a catepsina (PCR-TthCATL), reportado por (Adriana C. Rodrigues et al., 2010) como capaz de identificar *T. theileri* de forma específica. No se contó con un plásmido para utilizar como control positivo de este PCR, se utilizó la muestra de referencia sospechosa a *T. theileri*.

**Tabla 9***Primers usados en la PCR-TthCATL para Trypanosoma theileri*

| <b>Primer</b> | <b>Secuencia</b>                                  |
|---------------|---|
| TthCATL1      | 5' - CGT CTC TGG CTC CGG TCA AAC - 3'             |
| DTO155        | 5' - TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT CCA GTA - 3' |

**Nota:** Recuperado de (Adriana C. Rodrigues et al., 2010).**Tabla 10***Reactivos utilizados para la PCR-TthCATL.*

| <b>Reactivos</b>  | <b>Stock</b> | <b>Concentración final</b> | <b>Volumen</b> |
|-------------------|--------------|----------------------------|----------------|
| <b>H2O</b>        | N/A          | -                          | 18.30 uL       |
| <b>Buffer</b>     | 10 X         | 1 X                        | 2.50 uL        |
| <b>P TthCATL1</b> | 10 uM/uL     | 0.50 uM/uL                 | 1.25 uL        |
| <b>P DTO155</b>   | 10 uM/uL     | 0.50 uM/uL                 | 1.25 uL        |
| <b>MgCl2</b>      | 20 mM/uL     | 2 mM/uL                    | -              |
| <b>dNTP</b>       | 10 uM/uL     | 0.2 uM/uL                  | 0.50 uL        |
| <b>Taq</b>        | 5 U/uL       | 1 U                        | 0.20 uL        |
| <b>ADN</b>        | -            | -                          | 1 uL           |
| <b>Total</b>      |              |                            | 25 uL          |

**Nota:** **P:** Primer; **MgCl2:** Cloruro de magnesio; **dNTP:** Desoxinucleotidos; **Taq:** Taq Polimerasa;**uM:** Micromolar; **uL:** mMcrolitro; **mM:** Milimolar; **U:** Unidades.

**Tabla 11**

*Condiciones de reacción para PCR-TthCATL.*

| <b>Ciclo</b> | <b>Proceso</b>            | <b>Temperatura</b> | <b>Tiempo</b> |
|--------------|---------------------------|--------------------|---------------|
| 1            | Desnaturalización inicial | 95 °C              | 1 min         |
|              | Desnaturalización         | 94 °C              | 1 min         |
| 35           | Hibridación               | 65 °C              | 1 min         |
|              | Extensión                 | 72 °C              | 1 min         |
| 1            | Extensión final           | 72 °C              | 10 min        |
| -            | Mantenimiento             | 4 °C               | -             |

**Nota:** °C: Grados centígrados; min: Minutos. Recuperado de (Adriana C. Rodrigues et al., 2010).

Los productos de la PCR-TthCATL se observaron en un gel de agarosa al 3% (p/v) con bromuro de etidio, corrido a 100V durante 45 minutos.

Los mix de reacción PCR se realizaron con Buffer de reacción PCR y Taq Polimerasa de abm© y mix de dNTP de LAROVA©. Las condiciones de reacción se llevaron a cabo en un termociclador PRIME Thermal modelo 3PRIMEBASE.

### ***Diagnóstico de Trypanosoma theileri en los muestreos***

Para el diagnóstico de *T. theileri* se utilizó el protocolo PCR capaz de amplificar las muestras diagnosticadas mediante pruebas parasitológicas como sospechosas a *T. theileri*. Las 207 muestras fueron evaluadas y se calculó la prevalencia del hemoparásito en cada uno de los muestreos.

$$Prevalencia = \frac{Total\ positivos}{Total\ del\ muestreo}$$

### ***Caracterización molecular por PCR anidada ITS***

Para la caracterización molecular se amplificó la región completa ITS, que incluye las regiones ITS1, 5.8 S e ITS2; según el protocolo de PCR anidado descrito por (Cox et al., 2005). Se utilizaron los primers para el PCR anidado ITS descritos en la Tabla 6. El mix de reacción y las condiciones de amplificación son los descritos en la Tabla 7 y Tabla 8, respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis estadístico en los muestreos con prevalencia de *T. theileri* para determinar el efecto del parásito en los bovinos. El análisis de datos se realizó en el software R versión 4.0.3. Los datos cuantitativos se analizaron usando una prueba T – Student o una prueba U de Mann-Whitney dependiendo de la normalidad de los datos de acuerdo a la prueba de Shapiro–Wilk. Los datos cualitativos se analizaron usando una prueba de Chi Cuadrado. Se consideraron las diferencias como significativas con un  $P < 0.05$ . Los gráficos se realizaron con el programa *GraphPad Prism* versión 8.0.1.

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Pruebas parasitológicas

De las 135 muestras tomadas en el camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo, 20 presentaban un hematocrito menor a 24 lo que se considera como anemia (Radostits et al., 2006), con una muestra (2021 - 017) positiva a Woo y sospechosa a *T. theileri* al comparar su tamaño con el de los glóbulos rojos (Anexo 1). Se puede tener certeza de que es *T. theileri* pues su tamaño es mucho mayor al de otros tripanosomas, teniendo un rango de 69 – 109  $\mu\text{m}$  en comparación a otras especies reportadas en el país como *T. vivax* (Medina, 2018) y *T. evansi* (Rodríguez, 2017), que tiene tamaños mucho menores de 18 – 31  $\mu\text{m}$  y 15 – 34  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Marc Desquesnes, 2004). Adicional solo se pudo visualizar la presencia de un solo tripanosoma en la capa leucocítica, lo que indicaría un baja parasitemia que es característica de *T. theileri*.

De las 46 muestras tomadas en el Tena 9 fueron positivas a Woo. El tamaño de los tripanosomas fue menor al esperado y con altas parasitema por lo que no se sospechó que fueran *T. theileri*, sin embargo en algunos casos estos tripanosomas pueden presentar un tamaño de 25  $\mu\text{m}$  que es comparable al de otras especies (Marc Desquesnes, 2004) por lo que se requiere evaluar su morfología en frotis o una prueba molecular para poder descartar.

No se pudo realizar hematocrito ni prueba de Woo a las muestras de Atacames al no ser muestras con sangre fresca.

**Tabla 12**

*Bovinos con anemia en los muestreos.*

| Muestreo                   | Fi | fr    | %      |
|----------------------------|----|-------|--------|
| <b>Santo Domingo 1</b>     | 1  | 0,022 | 2,22%  |
| <b>Santo Domingo 2</b>     | 13 | 0,282 | 28,26% |
| <b>Santo Domingo 3</b>     | 6  | 0,136 | 13,64% |
| <b>Total Santo Domingo</b> | 20 | 0,148 | 14,81% |

**Nota:** fi: Frecuencia absoluta. fr: Frecuencia relativa. %: Frecuencia relativa en porcentaje.

**Tabla 13**

*Muestras positivas a Woo en los muestreos.*

| Muestreo                   | fi | fr    | %      |
|----------------------------|----|-------|--------|
| <b>Santo Domingo 1</b>     | 1  | 0,023 | 2,27%  |
| <b>Santo Domingo 2</b>     | 0  | 0,000 | 0,00%  |
| <b>Santo Domingo 3</b>     | 0  | 0,000 | 0,00%  |
| <b>Total Santo Domingo</b> | 1  | 0,007 | 0,74%  |
| <b>Tena</b>                | 9  | 0,196 | 19,57% |

**Nota:** fi: Frecuencia absoluta. fr: Frecuencia relativa. %: Frecuencia relativa en porcentaje.

Ninguna de las muestras del camal EP Mancomunada Trópico Húmedo dio positiva a *Trypanosoma spp.* en frotis sanguíneo, tampoco se encontraron tripanosomas en los frotis de las muestras de Atacames proporcionadas por Agrocalidad. La usencia de tripanosomas en el frotis de la muestra sospechosa puede deberse a la baja parasitemia del parásito, pues en una prueba de Woo es mucho más sensibles que un frotis, al analizar un volumen de sangre 15 veces mayor. De las muestras del Tena 5 dieron positivas a frotis para *Trypanosoma spp.*, en base a la morfología de los tripanosomas en frotis se puede descartar que sea *T. theileri* pues no tiene sus

principales características que son un kinetoplasto cercano a su núcleo y la parte trasera rígida y en forma de punta (Marc Desquesnes, 2004).

**Tabla 14**

*Muestras positivas a Trypanosoma spp. por frotis en los muestreos.*

| <b>Muestreo</b>            | <b>fi</b> | <b>fr</b> | <b>%</b> |
|----------------------------|-----------|-----------|----------|
| <b>Santo Domingo 1</b>     | 0         | 0,000     | 0,00%    |
| <b>Santo Domingo 2</b>     | 0         | 0,000     | 0,00%    |
| <b>Santo Domingo 3</b>     | 0         | 0,000     | 0,00%    |
| <b>Total Santo Domingo</b> | 0         | 0,000     | 0,00%    |
| <b>Tena</b>                | 6         | 0,130     | 13,04%   |
| <b>Atacames</b>            | 0         | 0,000     | 0,00%    |

**Nota:** fi: Frecuencia absoluta. fr: Frecuencia relativa. %: Frecuencia relativa en porcentaje.

#### **Evaluación de distintas pruebas PCR en muestras identificadas como *Trypanosoma theileri***

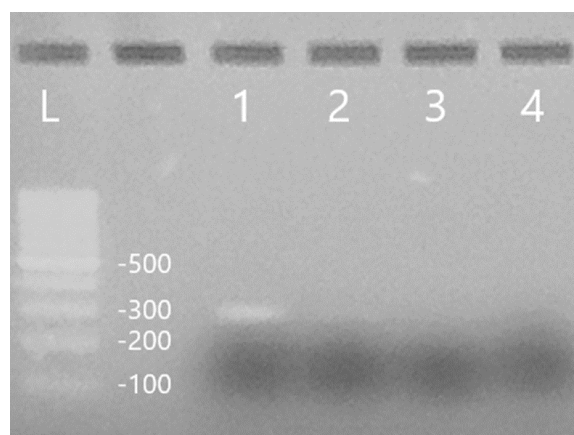
De los tres protocolos evaluados solo la PCR-TthCATL dio un amplicón con la muestra 2021 – 017 (Anexo 4), obteniéndose un fragmento de aproximadamente 300 pb como se observa en la **Figura 5**. Realizándose la amplificación de forma exitosa al utilizar 1 uL de ADN.

El tamaño obtenido es similar al de ~279 pb reportado como positivo a *T. theileri* para el PCR TthCATL (Adriana C. Rodrigues et al., 2010) por lo que se puede considerar a la muestra como positiva. Que no haya existido una amplificación con la PCR cdCatL ni la anidada ITS indicaría problemas en el diagnóstico pues existen reportes previos de amplificación de *T. theileri* usando estos protocolos (Adriana C. Rodrigues et al., 2010) (Cox et al., 2005). Problemas en el protocolo de estandarización en la PCR cdCatL y la anidada ITS se pueden descartar por la presencia de amplificación del control positivo (Anexo 4).



### Figura 5

Resultado del PCR – TthCATL en gel de agarosa al 3%.



**Nota:** L: Ladder de 100pb; 1: 1uL; 2: 2uL; 3: 2uL; 4: Control negativo.

No es la primera vez que se reportan problemas para el diagnóstico de *T. theileri* utilizando protocolos descritos como exitosos. (Ahmed et al., 2013) no pudo amplificar mediante la Tth625-PCR (A. C. Rodrigues et al., 2003) muestras previamente identificadas como *T. theileri* mediante la PCR anidada ITS (Cox et al., 2005). Recientemente (Nakamura et al., 2021) reportó problemas de sensibilidad en la PCR cdCatL, amplificando solo 91 de 143 muestras identificadas positivas a *Trypanosoma spp.* mediante una PCR con el ITS1 como diana (Gaithuma et al., 2019). En este caso se presenta un problema similar, pues la PCR cdCatL no pudo amplificar la muestra 2021 – 017 posteriormente identificada como *T. theileri* mediante la PCR TthCATL. Debido a que ambas PCR, TthCATL y cdCatL, comparten el mismo primer reverse DTO 155 (Adriana C. Rodrigues et al., 2010) (Cortez et al., 2009), el problema de sensibilidad se debería al primer forward DTO154 de la PCR cdCatL que está diseñado para anclarse en el dominio catalítico de CatL. Si bien esta región es conservada, el uso de primer genéricos puede tener problemas de sensibilidad al presentar poca homología con ciertas cepas de algunas especies de tripanosomas, de forma similar a lo que sucede con primers muy específicos (OIE,

2019). Alguna mutación en estas cepas de *T. theileri* que reduzca la afinidad del primer DTO154 tendría que ser comprobada mediante secuenciación.

Las PCR anidadas han sido descritas como más sensibles (M. Desquesnes & Dávila, 2002) llegando incluso a presentar falsos positivos (OIE, 2019), lo que contrasta con las PCR que utilizan el ITS como diana, pues se considera que las características de este marcador molecular afectan al diagnóstico. Esto podría ser por problemas de sensibilidad debido al menor número de copias del ADNr en comparación al genómico o por poca homología de los primers (M. Desquesnes & Dávila, 2002), suceso que ya ha sido reportado previamente para *T. vivax* en PCR genéricos que usan el ITS1 como diana (M Desquesnes et al., 2001). Una mezcla de estos factores puede estar influyendo en que la PCR anidada ITS no pueda amplificar la muestra sospechosa (2021 – 017). Esto complicaría su uso como método de diagnóstico efectivo, a lo que hay que agregar que este PCR amplifica varias especies de tripanosoma, y si bien se pueden diferenciar a *T. theileri* por el peso molecular, los tamaños en los geles no siempre son confiables, por lo que a veces se requiere de secuenciación para confirmar el diagnóstico (OIE, 2019).

#### **Identificación y prevalencia de *Trypanosoma theileri* mediante PCR - TthCATL**

En Ecuador ya se han presentado brotes de tripanosomas con mortalidad en donde se ha encontrado *Trypanosoma vivax* junto a otras especies como *Trypanosoma godfeyi* (Medina, 2018). Además de ya contar con reportes de la presencia de *T. theileri* en muestras provenientes de Santo Domingo (Rodríguez, 2017) y existir fauna salvaje en la región infectada con este tripanosoma (Orozco et al., 2020) (Jaimes-Dueñez et al., 2020), razones por la cual se esperaría encontrar *T. theileri* en los muestreos.

De las 135 muestras del camal EP Mancomunada Trópico Húmedo, catorce fueron diagnosticadas como positivas a *T. theileri* por la PCR – TthCATL (Anexo 5) dando una prevalencia del 10.37 %, mientras que no se encontraron muestras positivas en los muestreos del Tena un de Atacames. Esta prevalencia es menor a las descritas en otros países y a la dada por (Cholota et al., 2018) para el Carmén, Manabí, donde encontró una prevalencia de *T. theileri* del 39.77% empleando la PCR anidado ITS. Esto no significa que la prevalencia de *T. theileri* encontrada en Santo Domingo sea menor a la esperada, pues si bien *T. theileri* se considera un hemoparásitico cosmopolita de prevalencia alta, presenta una gran variabilidad dependiendo del lugar del muestreo incluso dentro de la misma región. (Jaimes-Dueñez et al., 2021) encontró prevalencias de *T. theileri* que van desde el 17.1% al 59.6% en cuatro departamentos de Colombia y (Cox et al., 2005) prevalencias de 2.97% y 32.64% en dos aldeas de Uganda. Por lo que en otras zonas del país y en las fincas de donde provienen los animales positivos se podrían encontrar prevalencias mucho más altas. De la misma forma la ausencia de *T. theileri* en los muestreos de Atacames y el Tena se puede deber a que en esas fincas en particular no presentaban estos tripanosomas.

También hay que tomar en cuenta que los animales muestreados en el Tena y Atacames fueron los que presentaban síntomas de hemotrópicos, cosa que *T. theileri* normalmente no presenta (Marc Desquesnes, 2004) (OIE, 2019). La ausencia de síntomas en los animales infectados con *T. theileri* dificulta su identificación en sitios con baja prevalencia, sin embargo, su presencia en una zona se podría comprobar más fácilmente en muestreos más grandes en sitios con alta concentración de animales como son los camales.

**Tabla 15**

*Muestras positivas a Trypanosoma theileri por PCR - TthCATL en los muestreos.*

| <b>Muestreo</b>            | <b>fi</b> | <b>fr</b> | <b>%</b> |
|----------------------------|-----------|-----------|----------|
| <b>Santo Domingo 1</b>     | 6         | 0,136     | 13,64%   |
| <b>Santo Domingo 2</b>     | 6         | 0,133     | 13,33%   |
| <b>Santo Domingo 3</b>     | 2         | 0,044     | 4,44%    |
| <b>Total Santo Domingo</b> | 14        | 0,104     | 10,37%   |
| <b>Tena</b>                | 0         | 0,000     | 0,00%    |
| <b>Atacames</b>            | 0         | 0,000     | 0,00%    |

**Nota:** fi: Frecuencia absoluta. fr: Frecuencia relativa. %: Frecuencia relativa en porcentaje.

### **Análisis estadístico**

Se analizó la presencia de síntomas en las poblaciones positivas y negativas a *T. theileri* dentro del muestreo en el Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo. No se realizaron estos análisis en los muestreos del Tena ni Atacames debido a la ausencia de diagnósticos positivos a *T. theileri*.

Se encontró la presencia de animales con anemia dentro de la población positiva a *T. theileri* por lo que se procedió a realizar un análisis estadístico para determinar si la población se puede considerar como anémica.

Se encontró normalidad dentro de los hematocritos de la población positiva del muestreo por lo que se procedió a realizar una prueba de T – Student para comprobar la presencia de anemia en los animales diagnosticados como positivos. El hematocrito de la población positiva no es menor a 24. No se puede considerar a la población como anémica.

Figura 6

Presencia de anemia y leucocitosis en la población positiva y negativa por PCR TthCATL a *T. theileri* en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo.

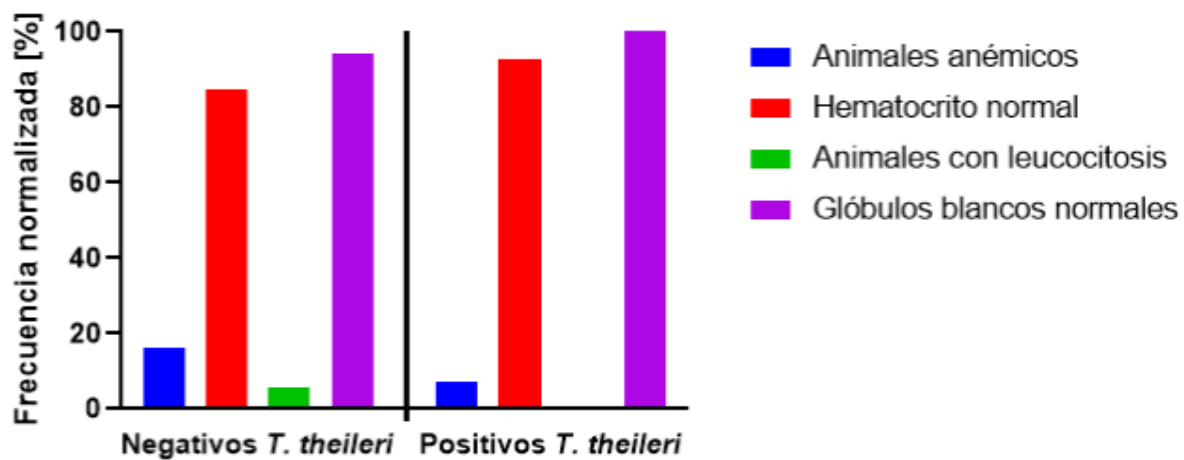
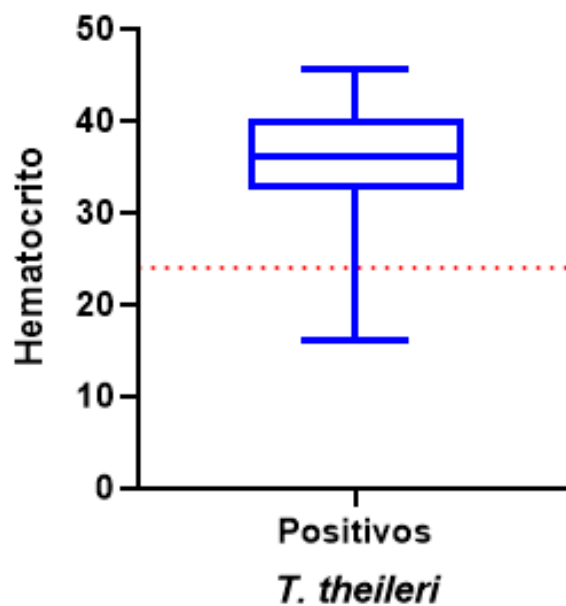


Figura 7

Boxplot de los hematocritos de los 14 animales positivos por PCR TthCATL a *T. theileri* en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo.



**Nota:** Línea roja: Valor de referencia para considerar anemia.

Tabla 16

*Prueba T Student para determinar la presencia de anemia en la población positiva.*

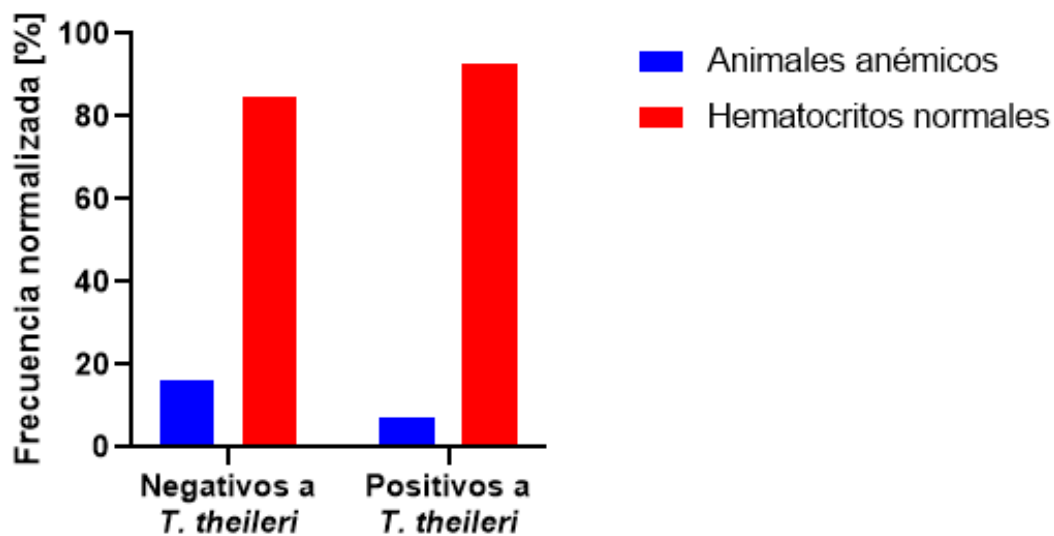
| Valor t | GL | Valor P |
|---------|----|---------|
| 5.5334  | 13 | 1       |

**Nota:** GL: Grados de libertad.

Al encontrarse la presencia de anemia tanto en la población positiva como negativa a *T. theileri* se procedió a realizar un análisis estadístico para determinar si la anemia se puede asociar al *T. theileri*.

Figura 8

*Presencia de anemia en la población positiva y negativa por PCR TthCATL a *T. theileri* en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo.*



Se procedió a realizar una prueba de Chi Cuadrado para comprobar si existe una asociación entre *T. theileri* y la anemia. No se encontró diferencia entre las distribuciones. El *T. theileri* no está asociado por sí solo a la anemia.

**Tabla 17**

*Prueba de Chi Cuadrado para determinar una asociación entre T. theileri y la anemia.*

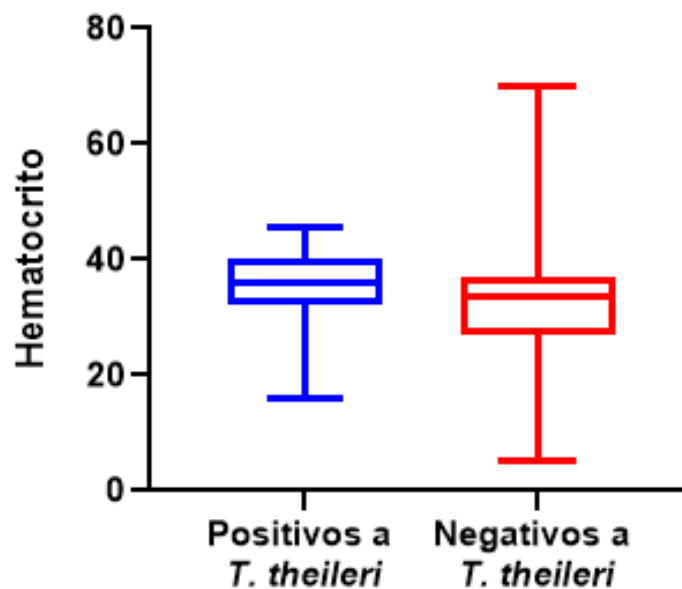
| Valor $\chi^2$ | GL | Valor P |
|----------------|----|---------|
| 0.23985        | 1  | 0.6243  |

**Nota:**  $\chi^2$ : Chi Cuadrado. GL: Grados de libertad.

Finalmente se realizó un análisis para determinar si *T. theileri* tiene un efecto en el hematocrito.

**Figura 9**

*Boxplots de los hematocritos de la población positiva y negativa por PCR TthCATL a T. theileri en el muestreo del Camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo.*



No se encontró normalidad dentro de los hematocritos de la población negativa del muestreo por lo que se procedió a realizar una prueba de U de Mann-Whitney para comprobar si existe diferencia entre los hematocritos de los animales diagnosticados como positivos y

negativos. No se encontró diferencia entre los hematocritos de la población de animales positivos y negativos. El *T. theileri* no tiene por si solo un efecto en el hematocrito.

**Tabla 18**

*Prueba U de Mann-Whitney para determinar si hay diferencia en el hematocrito de la población positiva y negativa.*

| Valor W | Valor P |
|---------|---------|
| 0.57604 | 0.1144  |

**Nota: Valor W:** Es el estadístico de contraste

La ausencia de normalidad en los hematocritos de la población negativa a *T. theileri* se puede deber a la presencia de anaplasma o babesia, que son otros hemotrópicos diferentes a los tripanosomas y que también causan anemia (Katsogiannou et al., 2018). En los frotis se pudo evidenciar la presencia de anaplasma en varios bovinos diagnosticados como negativos a *T. theileri*, por lo que en este grupo existirían dos poblaciones, una sana y otra enferma, lo que afecta a la normalidad. De igual forma se consideró a la población negativa como una sola debido a que algunos de los bovinos positivos a *T. theileri* también tenían anaplasma y a que el estudio de este hemotrópico es algo que excede los objetivos de este trabajo. El anaplasma no afectó a la normalidad del hematocrito de la población positiva debido a que su número era pequeño. El problema de la normalidad se solucionó aplicando la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney que cumple la misma función que una prueba de T para dos muestras.

Con estos resultados se puede afirmar que la presencia de anemia dentro de un animal positivos a *T. theileri* no se debe al tripanosoma. Esto coincide con los reportes generales de que este tripanosoma no es patogénico (Marc Desquesnes, 2004), sin embargo, la presencia de anemia en un animal puede estar influenciada por el carácter oportunista del tripanosoma pues



no es normal que un animal presente anemia (Katsogiannou et al., 2018). Para comprobar esto habría que evaluar factores como la presencia de otros hemotrópicos, preñez o problemas de alimentación (Bittner et al., 2021), que han sido reportados en casos de *T. theileri* con signos clínicos. En este muestreo no se evaluó la presencia de estos factores pues, además de exceder los objetivos del trabajo, el tamaño de la población positiva no era el adecuado. Algunos autores (Jaimes-Dueñez et al., 2018) han encontrado un efecto del *T. theileri* en el hematocrito de los bovinos, encontrando que los animales infectados presentarían valores significativamente menores a los sanos, aunque sin llegar a ser anemia. No se pudo evidenciar este efecto del *T. theileri*, probablemente por la presencia de anemia en la población no infectada, lo que enmascara el efecto del tripanosoma.

No se encontró la presencia de leucocitosis en los animales diagnosticados como positivos a *T. theileri*. La ausencia de leucocitosis también reafirma que *T. theileri* es no patogénico. Infecciones experimentales han determinado que un aumento en los leucocitos sucedería a las dos semanas de la infección y que posteriormente decrecerían, alcanzando rara vez valores que se puedan considerar como leucocitosis (Cross et al., 1971). De encontrarse leucocitosis sucedería en los primeros días de infección, por lo que se podría considerar que todos los animales positivos tienen una infección crónica. La presencia de leucocitosis indicando infecciones recientes podría ser señal de la presencia de los vectores en la zona donde provienen los animales.

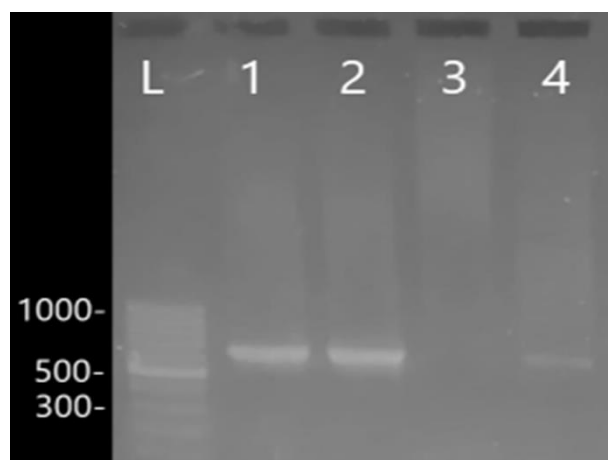
#### **Caracterización molecular de *Trypanosoma theileri* mediante PCR anidada - ITS**

Las catorce muestras positivas a la PCR - TthCATL fueron sometidas a la PCR anidada – ITS, obteniéndose once amplicones de aproximadamente 700 pb como se observa en la **Figura**

10. Las muestras que no se pudieron amplificar utilizando este protocolo PCR fueron las 2021 – 017, 2021 – 070 y 2021 – 078.

### Figura 10

Resultado de la PCR anidada – ITS en gel de agarosa al 1,5%.



**Nota:** L: Ladder de 100 pb; 1: Muestra 2021 - 008; 2: Muestra 2021 - 010; 3: Muestra 2021 - 017; 4: Muestra 2021 - 026.

El tamaño de los amplicones obtenidos difiere a los reportados previamente por (Cox et al., 2005) que estimó un tamaño de ~990 pb para *T. theileri*, y se aproxima más a los datos para *T. vivax* que es de ~620 pb. Sin embargo, la variabilidad en los amplicones de la región completa ITS también ha sido reportada por diferentes autores, (H. Auty et al., 2012) encontró un fragmento identificado por secuenciación como *T. theileri* con un tamaño 70 pb menor al esperado, (Rodríguez, 2017) en un estudio realizado en el Camal Metropolitano de Quito reportó amplicones de 800 – 900 pb para *T. theileri* y finalmente (Cholota-Iza et al., 2016) en muestras del cantón El Carmén, Manabí, encontró *T. theileri* con amplicones de ~750 pb. Esto indicaría una amplia variedad en las regiones ITS de los *T. theileri* que existe en el país, lo que podría deberse a la hipervariabilidad que presenta este marcador molecular. Los resultados

obtenidos en este trabajo son más próximos a los reportados por (Cholota-Iza et al., 2016) y se tiene la certeza de que las muestras son positivas a *T. theileri* por la PCR TthCATL realizada anteriormente. Esto indicaría que las cepas de *T. theileri* presentes en la zona tendrían características moleculares diferentes a los reportados en África. Una secuenciación sería necesaria para confirmar que los amplicones obtenidos corresponden a la región completa ITS y no a alguna amplificación inespecífica que se presente en estas cepas. La presencia de una contaminación se descarta por la ausencia de banda en el control negativo (Anexo 4).

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Se determinó que la prueba de diagnóstico molecular PCR TthCatL permite identificar a *Trypanosoma theileri* exitosamente y de forma específica. Al dar positivo en una muestra obtenida en campo y previamente identificada mediante pruebas parasitológicas.

Se encontró una prevalencia de *Trypanosoma theileri* del 10.37% en el muestreo del camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo, al obtenerse 14 positivos de un total de 135 muestras analizadas, sin poderse identificar *Trypanosoma theileri* en los muestreos de Atacames y el Tena.

Se concluye que las cepas de *Trypanosoma theileri* analizadas no son patogénicas al no poderse asociar estadísticamente al tripanosoma los signos clínicos de anemia que presentaban los bovinos diagnosticados como positivos en el muestreo. El poder descartar o confirmar si es un parásito oportunista requiere de un muestreo más grande.

Se concluye que las cepas de *Trypanosoma theileri* encontradas en el camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo comparten características moleculares con las cepas de El Carmen, Manabí.

## CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar para el diagnóstico específico de *Trypanosoma theileri* la prueba molecular TthCATL en lugar de la anidada ITS o la cdCatL, bajo las condiciones especificadas en este trabajo.

Realizar estudios en las cepas identificadas en el camal EP Mancomunada Trópico Húmedo de Santo Domingo para determinar si existe mutaciones en las secuencias del dominio catalítico de la catepsina que impidan la amplificación usando el primer DTO154.

Realizar muestreos más grandes y en los camales del Tena y Atacames, para poder confirmar la presencia de este hemoparásito en estas zonas.

Confirmar los efectos del *Trypanosoma theileri* en el ganado bovino mediante infecciones experimentales controladas y tomando en cuenta los factores de riesgo, para comprobar si el parásito es oportunista.

Realizar secuenciación y estudios filogenéticos a los amplicones obtenidos en este trabajo mediante la PCR anidada ITS.

**CAPÍTULO VII:****BIBLIOGRAFÍA**

- Ahmed, H. A., Picozzi, K., Welburn, S. C., & Macleod, E. T. (2013). A comparative evaluation of PCR- Based methods for species- Specific determination of African animal trypanosomes in Ugandan cattle. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-316>
- Amato, B., Mira, F., Di Marco Lo Presti, V., Guercio, A., Russotto, L., Gucciardi, F., Vitale, M., Lena, A., Loria, G. R., Puleio, R., & Cannella, V. (2019). A case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma theileri* in Sicily, Italy. *Parasitology Research*, 118(9), 2723–2727. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06390-y>
- Auty, H., Anderson, N. E., Picozzi, K., Lembo, T., Mubanga, J., Hoare, R., Fyumagwa, R. D., Mable, B., Hamill, L., Cleaveland, S., & Welburn, S. C. (2012). Trypanosome Diversity in Wildlife Species from the Serengeti and Luangwa Valley Ecosystems. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001828>
- Auty, H. K., Torr, S. J., M, T., Jayaraman, S., & Morrison, L. J. (2015). Cattle trypanosomosis : the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control Trypanosome species of relevance to cattle. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 4(2), 587–598. [www.tritrypdb](http://www.tritrypdb).
- Berti, P. J., & Storer, A. C. (1995). Alignment/Phylogeny of the Papain Superfamily of Cysteine Proteases. *Journal of Molecular Biology*, 246(2), 273–283. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0083>
- Bittner, L., Krämer, K., Wöckel, A., Snedec, T., Delling, C., Böttcher, D., Köller, G., Baumgartner, W., Richardt, W., & Starke, A. (2021). Malnutrition as the cause of recumbency in suckler

- cows associated with *Trypanosoma theileri* infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 63(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13028-020-00567-7>
- Böse, R., Friedhoff, K. T., Olbrich, S., Büscher, G., & Domesy, I. (1987). Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. *Parasitology Research*, 73(5), 421–424. <https://doi.org/10.1007/BF00538199>
- Böse, Reinhard, Friedhoff, K. T., & Olbrich, S. (1987). Transmission of Megatrypanum Trypanosomes to *Cervus dama* by Tabanidae<sup>1</sup>. *The Journal of Protozoology*, 34(1), 110–113. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03143.x>
- Böse, Reinhard, & Heister, N. C. (1993). Development of *Trypanosoma (M.) theileri* in tabanids. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(6), 788–792. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb04475.x>
- Caffrey, C. R., & Steverding, D. (2009). Kinetoplastid papain-like cysteine peptidases. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.04.009>
- 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>
- Cholota-Iza, C. E., Chávez-Larrea, M. A., Gómez-Mendoza, G. A., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2016). *PCR anidada para la detección de Trypanosoma spp. en bovinos en el Cantón El Carmen, Provincia de Manabí, Ecuador.pdf*. IV Congreso Redu.

- Cholota, C., Reyna-Bello, A., & Chávez, M. A. (2018). *Reporte de la presencia de Trypanosoma spp. mediante PCR anidada y ELISA indirecto en el ganado bovino de la parroquia San Pedro de Suma del cantón El Carmen, provincia de Manabí, Ecuador.*  
<http://redisd.org/index.php/es/poster-I020-agro/552-reporte-de-la-presencia-de-trypanosoma-spp-mediante-pcr-anidada-y-elisa-indirecto-en-el-ganado-bovino-en-el-canton-el-carmen>
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>
- Coscarón, S., & Papavero, N. (2009). Catalogue Of Neotropical Diptera. Tabanidae. *Neotropical Diptera*, 16, 1–199.
- Cox, A., Tilley, A., McOdimba, F., Fyfe, J., Eisler, M., Hide, G., & Welburn, S. (2005). A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental Parasitology*, 111(1), 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.014>
- Cross, R. F., Smith, C. K., & Redman, D. R. (1971). Observations on *Trypanosoma theileri* infection in cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 35(1), 12–17.
- Dávila, A. M. R., & Silva, R. A. (2000). Animal trypanosomiasis in South America. Current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916, 199–212. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05291.x>
- Desquesnes, M., & Dávila, A. M. R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: A review and perspectives. *Veterinary Parasitology*,



109(3–4), 213–231. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4)

Desquesnes, M, McLaughlin, G., Zoungrana, A., & Dávila, A. M. (2001). Detection and identification of Trypanosoma of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 610–614. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00161-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00161-8)

Desquesnes, Marc. (2004). Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. In *OIE (World Organisation for Animal Health)*. <https://doi.org/10.1017/s0031182005007870>

Fisher, A. C., Schuster, G., Cobb, W. J., James, A. M., Cooper, S. M., Pérez de León, A. A., & Holman, P. J. (2013). Molecular characterization of Trypanosoma (Megatrypanum) spp. infecting cattle (*Bos taurus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and elk (*Cervus elaphus canadensis*) in the United States. *Veterinary Parasitology*, 197(1–2), 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.037>

Fraga, J., Fernández-Calienes, A., Montalvo, A. M., Maes, I., Deborggraeve, S., Büscher, P., Dujardin, J.-C., & Van der Auwera, G. (2016). Phylogenetic analysis of the Trypanosoma genus based on the heat-shock protein 70 gene. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 43, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.016>

Gaithuma, A. K., Yamagishi, J., Martinelli, A., Hayashida, K., Kawai, N., Marsela, M., & Sugimoto, C. (2019). A single test approach for accurate and sensitive detection and taxonomic characterization of trypanosomes by comprehensive analysis of internal transcribed spacer 1 amplicons. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006842>

- Garcia, H. A., Kamyngkird, K., Rodrigues, A. C., Jittapalapong, S., Teixeira, M. M. G., & Desquesnes, M. (2011). High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Veterinary Parasitology*, *180*(3–4), 363–367. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.017>
- Garcia, H. A., Rodrigues, A. C., Martinkovic, F., Minervino, A. H. H., Campaner, M., Nunes, V. L. B., Paiva, F., Hamilton, P. B., & Teixeira, M. M. G. (2011). Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma* (Megatrypanum) genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *International Journal for Parasitology*, *41*(13–14), 1385–1396. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.09.001>
- Garcia, H. A., Rodrigues, C. M. F., Rodrigues, A. C., Pereira, D. L., Pereira, C. L., Camargo, E. P., Hamilton, P. B., & Teixeira, M. M. G. (2018). Remarkable richness of trypanosomes in tsetse flies (*Glossina morsitans morsitans* and *Glossina pallidipes*) from the Gorongosa National Park and Niassa National Reserve of Mozambique revealed by fluorescent fragment length barcoding (FFLB). *Infection, Genetics and Evolution*, *63*, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.005>
- García, H., García, M. E., Pérez, G., Bethencourt, A., Zerpa, É., Pérez, H., & Mendoza-León, A. (2006). Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: Association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, *100*(4), 297–305. <https://doi.org/10.1179/136485906X91521>
- Gibson, W., Bingle, L., Blendeman, W., Brown, J., Wood, J., & Stevens, J. (2000). Structure and sequence variation of the trypanosome spliced leader transcript. *Molecular and*

*Biochemical Parasitology*, 107(2), 269–277. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(00\)00193-](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(00)00193-6)

6

- 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 *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261–285). Springer Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11)
- Hajihassani, A., Maroufi, S., Esmailnejad, B., Khorram, H., Tavassoli, M., Dalir-Naghadeh, B., & Samiei, A. (2020). Hemolytic anemia associated with trypanosoma theileri in a cow from Kurdistan province, west of Iran. *Veterinary Research Forum*, 11(2), 191–193. <https://doi.org/10.30466/vrf.2019.103834.2465>
- Hatama, S., Shibahara, T., Suzuki, M., Kadota, K., Uchida, I., & Kanno, T. (2007). Isolation of a Megatrypanum trypanosome from sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) in Japan. *Veterinary Parasitology*, 149(1–2), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.019>
- Hernandez, R., Martinez-Calvillo, S., Hernandez-Rivas, R., & Gomez, E. (1993). *Trypanosoma cruzi* ribosomal RNA genes: A review. *Biological Research*, 26(1–2), 109–114.
- Jaimes-Dueñez, J., Cantillo-Barraza, O., Triana-Chávez, O., & Mejia-Jaramillo, A. M. (2020). Molecular surveillance reveals bats from eastern Colombia infected with *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma wauwau*-like parasites. *Preventive Veterinary Medicine*, 184(September). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105159>
- Jaimes-Dueñez, J., Mogollón-Waltero, E., Árias-Landazabal, N., Rangel-Pachon, D., Jimenez-Leaño, A., Mejia-Jaramillo, A., & Triana-Chávez, O. (2021). Molecular surveillance of *Trypanosoma* spp. reveals different clinical and epidemiological characteristics associated

- with the infection in three creole cattle breeds from Colombia. *Preventive Veterinary Medicine*, 193(June). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105414>
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 249(52), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004>
- Katsogiannou, E. G., Athanasiou, L. V., Christodoulopoulos, G., & Polizopoulou, Z. S. (2018). Diagnostic approach of anemia in ruminants. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(3), 1033–1046. <https://doi.org/10.12681/jhvms.18866>
- Keita, M. L., Medkour, H., Sambou, M., Dahmana, H., & Mediannikov, O. (2020). Tabanids as possible pathogen vectors in Senegal (West Africa). *Parasites and Vectors*, 13(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04375-w>
- Kelly, S., Ivens, A., Mott, G. A., O'Neill, E., Emms, D., Macleod, O., Voorheis, P., Tyler, K., Clark, M., Matthews, J., Matthews, K., & Carrington, M. (2017). An alternative strategy for trypanosome survival in the mammalian bloodstream revealed through genome and transcriptome analysis of the ubiquitous bovine parasite *trypanosoma (megatrypanum) theileri*. *Genome Biology and Evolution*, 9(8), 2093–2109. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx152>
- Latif, A. A., Bakheit, M. A., Mohamed, A. E., & Zwegarth, E. (2004). High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71(4), 251–256. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v71i4.228>
- Lee, Y. F., Cheng, C. C., Chen, J. S., Lin, N. N., Hung, Y. W., Wang, J. M., Tu, W. C., Tung, K. C., &

- Chiu, Y. T. (2013). Evidence of intracellular stages in *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* in non-phagocytic mammalian cells. *Veterinary Parasitology*, *191*(3–4), 228–239.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.027>
- Lima, A. P. C., Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Scharfstein, J., Storer, A. C., & Vernet, T. (1994). Identification of new cysteine protease gene isoforms in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *67*(2), 333–338. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00144-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00144-8)
- Magez, S., Pinto Torres, J. E., Oh, S., & Radwanska, M. (2021). Salivarian trypanosomes have adopted intricate host-pathogen interaction mechanisms that ensure survival in plain sight of the adaptive immune system. *Pathogens*, *10*(6).  
<https://doi.org/10.3390/pathogens10060679>
- Magez, S., & Radwanska, M. (2009). African trypanosomiasis and antibodies: Implications for vaccination, therapy and diagnosis. *Future Microbiology*, *4*(8), 1075–1087.  
<https://doi.org/10.2217/fmb.09.65>
- Medina, M. (2018). Caracterización molecular y análisis filogenético de *Trypanosoma* spp. en tres fincas ganaderas del cantón Chone, Provincia de Manabí, Ecuador. *Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE*, 1–86.  
<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/15337/T-ESPE-040551.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Morzaria, S. P., Latif, A. A., Jongejan, F., & Walker, A. R. (1986). Transmission of a *Trypanosoma* sp. to cattle by the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum*. *Veterinary Parasitology*, *19*(1–2), 13–21. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(86\)90026-9](https://doi.org/10.1016/0304-4017(86)90026-9)
- Nakamura, Y., Hayashida, K., Delesalle, V., Qiu, Y., Omori, R., Simuunza, M., Sugimoto, C.,

- Namangala, B., & Yamagishi, J. (2021). Genetic Diversity of African Trypanosomes in Tsetse Flies and Cattle From the Kafue Ecosystem. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(January).  
<https://doi.org/10.3389/fvets.2021.599815>
- OIE. (2019). Tripanosomosis Animales. In *Manual terrestre de la OIE* (pp. 1–15).
- Orozco, M. M., Argibay, H. D., Minatel, L., Guillemi, E. C., Berra, Y., Schapira, A., Di Nucci, D., Marcos, A., Lois, F., Falzone, M., & Farber, M. D. (2020). A participatory surveillance of marsh deer (*Blastocercus dichotomus*) morbidity and mortality in Argentina: First results. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02533-x>
- Pacheco, T. D. A., Marcili, A., Costa, A. P. da, Witter, R., Melo, A. L. T., Boas, R. V., Chitarra, C. S., Dutra, V., Nakazato, L., & Pacheco, R. de C. (2018). Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 27(4), 579–583. <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180049>
- Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., & Constable, P. (2006). *VETERINARY MEDICINE A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses* (10th ed.). Elsevier.
- Ramírez, J. D., Tapia-Calle, G., Muñoz-Cruz, G., Poveda, C., Rendón, L. M., Hincapié, E., & Guhl, F. (2014). Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infection, Genetics and Evolution*, 22, 250–256.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.022>
- Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 14, 4–7.

- Rodrigues, A. C., Campaner, M., Takata, C. S. A., Dell' Porto, A., Milder, R. V., Takeda, G. F., & Teixeira, M. M. G. (2003). Brazilian isolates of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Veterinary Parasitology*, *116*(3), 185–207. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(03\)00236-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(03)00236-x)
- Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Batista, J. S., Minervino, A. H. H., Góes-Cavalcante, G., Maia da Silva, F., Ferreira, R. C., Campaner, M., Paiva, F., & Teixeira, M. M. G. (2010). Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*, *137*(1), 111–122. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991053>
- Rodrigues, A. C., Paiva, F., Campaner, M., Stevens, J. R., Noyes, H. A., & Teixeira, M. M. G. (2006). Phylogeny of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, *132*(2), 215–224. <https://doi.org/10.1017/S0031182005008929>
- Rodrigues, Adriana C., Garcia, H. A., Ortiz, P. A., Cortez, A. P., Martinkovic, F., Paiva, F., Batista, J. S., Minervino, A. H., Campaner, M., Pral, E. M., Alfieri, S. C., & Teixeira, M. M. G. (2010). Cysteine proteases of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri*: Cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*, *59*(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.002>
- Rodríguez, A. (2017). Caracterización molecular mediante clonación y secuenciación de regiones ITS de diferentes aislados de *Trypanosoma* sp. en Ecuador. *Universidad de Las Fuerzas Armadas ESPE*, 71.

<http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/21000/13251/T-ESPE-057294.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Schwede, A., & Carrington, M. (2010). Bloodstream form trypanosome plasma membrane proteins: Antigenic variation and invariant antigens. *Parasitology*, *137*(14), 2029–2039. <https://doi.org/10.1017/S0031182009992034>
- Seifi, H. A. (1995). Clinical trypanosomosis due to *Trypanosoma theileri* in a cow in Iran. *Tropical Animal Health and Production*, *27*(2), 93–94. <https://doi.org/10.1007/BF02236319>
- Siqueira-Neto, J. L., Debnath, A., McCall, L.-I., Bernatchez, J. A., Ndao, M., Reed, S. L., & Rosenthal, P. J. (2018). Cysteine proteases in protozoan parasites. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(8), e0006512. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006512>
- Sood, N. K., Singla, L. Das, Singh, R. S., & Uppal, S. K. (2011). Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: A case report. *Veterinarni Medicina*, *56*(2), 82–84. <https://doi.org/10.17221/1580-VETMED>
- Suganuma, K., Kondoh, D., Sivakumar, T., Mizushima, D., Elata, A. T. M., Thekiso, O. M. M., Yokoyama, N., & Inoue, N. (2019). Molecular characterization of a new *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. *Parasitology Research*, *118*(6), 1927–1935. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06313-x>
- Thompson, C. K., Godfrey, S. S., & Thompson, R. C. A. (2014). Trypanosomes of Australian mammals: A review. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *3*(2), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.02.002>
- Townsend, J., Duffus, W. P. H., & Lammas, D. A. (1982). Importance of competitive binding in the



- detection of antigen specific bovine isotypes and subisotypes by the micro ELISA. *Research in Veterinary Science*, 33(3), 319–327. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32309-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32309-9)
- Urban, I., Boiani Santurio, L., Chidichimo, A., Yu, H., Chen, X., Mucci, J., Agüero, F., & Buscaglia, C. A. (2011). Molecular diversity of the Trypanosoma cruzi TcSMUG family of mucin genes and proteins. *Biochemical Journal*, 438(2), 303–313. <https://doi.org/10.1042/BJ20110683>
- Van Hellemond, J. J., Hoek, A., Schreur, P. W., Chupin, V., Özdirekcan, S., Geysen, D., Van Grinsven, K. W. A., Koets, A. P., Van Den Bossche, P., Geerts, S., & Tielens, A. G. M. (2007). Energy metabolism of bloodstream form Trypanosoma theileri. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1693–1696. <https://doi.org/10.1128/EC.00130-07>
- Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacón, G., Sanz, P. V., Büscher, P., & Touratier, L. (2008). Presence of Trypanosoma theileri in Spanish cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 352–354. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.016>
- WARD, W. H., HILL, M. W. M., MAZLIN, I. D., & FOSTER, C. K. (1984). Anaemia associated with a high parasitaemia of Trypanosoma theileri in a dairy cow. *Australian Veterinary Journal*, 61(10), 324–324. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1984.tb07140.x>
- Wells, E. A. (1971). Studies on Trypanosoma theileri-like trypanosomes of cattle. I. Culture and storage of isolations. *The British Veterinary Journal*, 127(10), 466–475. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)37334-7](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)37334-7)
- Wells, E. A., Lumsden, W. H., & McNeillage, G. J. (1968). Isolation of trypanosomes of the section stercoraria from cattle in Nigeria and the United Kingdom. *The British Veterinary Journal*, 124(9), 382–392. [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)39203-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)39203-5)
- Woo, P. T. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African

trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 27(4), 384–386.

Ybañez, A. P., Sivakumar, T., Ybañez, R. H. D., Vincoy, M. R. B., Tingson, J. A., Perez, Z. O., Gabotero, S. R., Buchorno, L. P., Inoue, N., Matsumoto, K., Inokuma, H., & Yokoyama, N. (2013). Molecular survey of bovine vector-borne pathogens in Cebu, Philippines. *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.013>