



**“Prevalencia del *Trypanosoma vivax* en bovinos provenientes de zonas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí, con previos reportes de enfermedades hemotrópicas.”**

Caiza Mena, Kelly Sabrina

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.

13 de septiembre del 2021



## Document Information

Analyzed document	KELLY SABRINA CAIZA MENA-ESPE-BIOTECNOLOGÍA.pdf (D112508993)
Submitted	9/13/2021 7:38:00 PM
Submitted by	
Submitter email	kscaiza@espe.edu.ec
Similarity	6%
Analysis address	us.fannypoza.unia@analysis.arkund.com

## Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.16_TRYPANOSOMOSIS.pdf">https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.16_TRYPANOSOMOSIS.pdf</a> Fetched: 6/2/2020 3:41:44 AM	 1
<b>SA</b>	<b>Universidad Regional Autónoma de los Andes / Jorge Isaac Cueva Villavicencio - ESPE - Biotecnología.pdf</b> Document Jorge Isaac Cueva Villavicencio - ESPE - Biotecnología.pdf (D112235228) Submitted by: jicueva@espe.edu.ec Receiver: us.fannypoza.unia@analysis.arkund.com	 9
<b>SA</b>	<b>PROYECTO DE TITULACION JIMMY JUMBO.pdf</b> Document PROYECTO DE TITULACION JIMMY JUMBO.pdf (D35649533)	 2
<b>SA</b>	<b>TESIS_MICHELL_MEDINA.docx</b> Document TESIS_MICHELL_MEDINA.docx (D43934924)	 9
<b>SA</b>	<b>TESIS 1.5.docx</b> Document TESIS 1.5.docx (D27838858)	 2
<b>W</b>	URL: <a href="https://docplayer.es/206983260-Evaluacion-de-la-transmision-transovarica-de-anaplasma-marginalis-y-babesia-spp-en.html">https://docplayer.es/206983260-Evaluacion-de-la-transmision-transovarica-de-anaplasma-marginalis-y-babesia-spp-en.html</a> Fetched: 9/4/2021 3:55:41 PM	 4



Firmado electrónicamente por:

**ARMANDO  
REYNA**

REYNA BELLO ARMANDO PhD

**DIRECTOR**



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, **“Prevalencia del *Trypanosoma vivax* en bovinos provenientes de zonas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí, con previos reportes de enfermedades hemotrópicas”** fue realizado por la señorita **Caiza Mena Kelly Sabrina** 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, 13 septiembre de 2021



Firmado electrónicamente por:  
**ARMANDO**  
**REYNA.....**

**REYNA BELLO ARMANDO PhD.**

C. C. 1758891830



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo/nosotros, **Caiza Mena Kelly Sabrina**, con cédula de ciudadanía n° 172720613-6., declaro/declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Prevalencia del *Trypanosoma vivax* en bovinos provenientes de zonas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí, con previos reportes de enfermedades hemotrópicas”** es de mi/nuestra 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, 13 de septiembre de 2021**

Firma

.....  
*Sabrina*

**Caiza Mena Kelly Sabrina**

C.C.: 1727206136

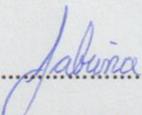


**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo **Caiza Mena Kelly Sabrina**, con cédula de ciudadanía n° 172720613-6, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Prevalencia del *Trypanosoma vivax* en bovinos provenientes de zonas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí, con previos reportes de enfermedades hemotrópicas”**: en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 13 de septiembre de 2021**

  
.....  
**Caiza Mena Kelly Sabrina**  
C.C.: 172720613-6

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

A Dios, quien me sostiene de su mano y me ayuda a culminar una nueva meta en mi vida.

A mi Madre, Leydi y a Wacho por siempre ser mi apoyo en todas las etapas de mi vida, por confiar en mí, por cuidarme, estar pendiente y alentarme siempre a continuar para alcanzar mis metas.

A mi Padre, Eddy por siempre estar presente mostrándome su apoyo para cumplir mis sueños e impulsándome a ser fuerte en la vida.

A mis hermanos, Erick, Scarleth y Joseph, y primos, Diana y Byron, que me acompañaron en todo momento y me cuidan, a pesar de nuestras diferencias, siempre están para ser mi aliento y continuar avanzando en mis proyectos.

A mi familia, por ser mi base en mi vida, estar pendiente de mí en cada momento, siempre dándome una palabra de aliento.

A las personas que no ya no se encuentran conmigo, por haber formado parte de vida y ayudarme en convertirme en la persona que soy hoy en día.

A mis seres queridos, gracias por estar conmigo en todo momento y brindarme su apoyo.

Kelly Sabrina Caiza Mena

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme culminar esta etapa de mi vida, ser mi fortaleza y darme una promesa para continuar adelante. A mis padres y familia, por su apoyo constante, en especial a mi abuela.

Al Dr. Armando Reyna, por su ayuda y la oportunidad de realizar mi proyecto de titulación con la línea de investigación BruTryp, por su constante ayuda y enseñanza dada durante toda la carrera y en este proyecto.

Agradezco a los doctores, Dr. Jorge Ron e ingenieros, Ing. Cristina Cholota e Ing. Dayana que forman parte del grupo de investigación BruTryp de la ESPE matriz, por su ayuda contante en todo el proyecto de titulación, por los conocimientos brindados, en las salidas de campo y en las en los procesos dentro del laboratorio, gracias por permitirme adquirir mayores conocimientos en las practicas realizadas.

Agradezco a la ESPAM y Agrocalidad, por su ayuda en las salidas de campo y la información compartida para realizar las pruebas pertinentes en este estudio.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio Jefferson, Jorge, Hugo, Mateo y Jordan por ser un apoyo y ayudarme en varios procesos del proyecto, además durante las salidas de campo.

Agradezco a mis compañeras, Ariana, Solange, Katherine, Briggith, Nicole, Stephany, Josselyn O. y Raquel de la carrera por apoyarme durante todo este trayecto, chicas gracias por ayudarme en cada momento de la carrera.

Kelly Sabrina Caiza Mena

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Caratula.....	1
Análisis Urkund .....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de auditoria .....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos .....	7
Listado de figuras.....	10
Lista de tablas .....	11
Lista de abreviaturas.....	12
Resumen .....	13
Abstract.....	14
Capítulo I: Introducción .....	15
1.1. Formulación del problema.....	15
1.2. Justificación.....	16
1.3. Objetivos del proyecto .....	17
1.3.1. Objetivo general .....	17
1.3.2. Objetivo específico .....	17
Capítulo II: Marco teórico .....	19
2.1. Generalidades.....	19
2.2. Distribución.....	19
2.3. Transmisión.....	21
2.4. Respuesta inmunitaria .....	22
2.5. <i>Trypanosoma vivax</i> .....	24
2.6. Taxonomía.....	24
2.7. Morfología.....	25
2.8. Signos clínicos .....	26
2.9. Tratamiento y control .....	27
2.10. Características moleculares .....	28
2.11. Métodos de diagnóstico .....	28
2.11.1. Métodos directos.....	29
2.11.1.1. Prueba de woo.....	29

2.11.2. Métodos moleculares .....	29
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	30
Capítulo III: Materiales y Métodos .....	32
3.1. Toma de muestra de sangre .....	32
3.2. Procesamiento de extracción de sangre periférica .....	32
3.3. Determinación del hematocrito.....	33
3.4. Tinción de frotis sanguíneos .....	33
3.5. Extracción de ADN total.....	33
3.6. Determinación de Calidad de ADN .....	34
3.7. PCR para detección de <i>Trypanosoma spp.</i> .....	34
3.8. PCR para detección de <i>Trypanosoma vivax</i> .....	36
3.9. PCR para detección de ITS .....	37
3.13. Análisis estadístico .....	39
3.13.1. Diseño no experimental .....	39
3.13.2. Variable de respuesta .....	39
3.13.3. Análisis.....	39
3.13.4. Estadística descriptiva .....	39
3.13.5. Datos de prevalencia .....	40
3.13.6. Estadística inferencial.....	40
Capítulo IV: Resultados y discusión .....	41
4.1. Pruebas parasitológicas (Woo y frotis sanguíneo).....	41
4.2. Hematocrito .....	43
4.3. Temperatura .....	47
4.4. Estandarización de protocolos para la extracción de ADN.....	50
4.5. Amplificación de fragmentos de <i>Trypanosoma spp.</i> .....	51
4.6. Estandarización de la PCR para <i>T. vivax</i> .....	53
4.3. Amplificación de fragmentos de CatL de <i>Trypanosoma vivax</i> .....	55
4.4. Prevalencia de <i>T. vivax</i> por muestreo .....	56
4.5. Amplificación de fragmentos de ITS .....	59
4.6. Análisis de similitud y homología de las secuencias amplificadas por ITS.....	62
Capítulo V: Conclusiones.....	64
Capítulo VI: Recomendaciones .....	65
Capítulo VII: Bibliografía .....	66

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Distribución del <i>Trypanosoma</i> spp. alrededor del mundo .....	21
<b>Figura 2</b> Ciclo de vida del <i>Trypanosoma vivax</i> , sus vectores mecánicos con su huésped ( <i>Magez et al., 2021</i> ). .....	22
<b>Figura 3</b> Ondas de parasitemia por la variación antigénica de su capa superficial .....	23
<b>Figura 4</b> Clasificación taxonómica del <i>Trypanosoma vivax</i> (Desquesnes, 2004) .....	25
<b>Figura 5</b> <i>Periodos de signos clínicos y patogenicidad de la tripanosomosis bovina.</i> .....	26
<b>Figura 6</b> <i>Gen de capticina L-like y primers para la amplificación</i> .....	30
<b>Figura 7</b> <i>Región del espaciador interno transcrito del rDNA y primers para su amplificación</i> .....	31
<b>Figura 8</b> <i>Morfología del T. vivax encontrado en los frotis sanguíneos de las muestras de Napo, 2021</i> .....	42
<b>Figura 9</b> Distribución de los niveles de hematocrito por provincias. ....	44
<b>Figura 10</b> Relación entre el Hematocrito y el diagnóstico obtenido por las pruebas rápidas, provincia Napo .....	47
<b>Figura 11</b> Relación de la temperatura y el diagnóstico obtenido por las pruebas rápidas.....	49
<b>Figura 12</b> <i>Amplificación de los protocolos en la extracción de ADN de las muestras procesadas, 2021</i> .....	51
<b>Figura 13</b> <i>Amplificación de fragmentos de Trypanosoma spp</i> .....	52
<b>Figura 14</b> <i>Amplificación de fragmentos de Trypanosoma spp de la provincia de Napo</i> ... ..	53
<b>Figura 15</b> <i>Estandarización de la PCR para fragmento específico de T. vivax</i> .....	54
<b>Figura 16</b> <i>Amplificación de fragmentos de Trypanosoma vivax por TviCatL-PCR</i> .....	55
<b>Figura 17</b> <i>Distribución de Trypanosoma vivax en bovinos de 4 provincias del Ecuador en 2021</i> .....	57
<b>Figura 18</b> <i>Contraste de muestras positivas con hematocrito y temperatura, por su tipo de diagnóstico</i> .....	60
<b>Figura 19</b> <i>Amplificación de fragmentos ITS de Trypanosoma vivax</i> .....	62

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Tratamientos empleados para la tripanosomosis en América Latina (Gonzatti et al., 2014).....	28
<b>Tabla 2</b> Protocolo para la extracción de sangre de bovino del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado de Riera et al. (2010) .....	33
<b>Tabla 3</b> Componentes de la PCR para amplificación de CatL de <i>Trypanosoma spp.</i> .....	35
<b>Tabla 4</b> Condiciones de la PCR para amplificación de CatL de <i>Trypanosoma spp.</i> .....	35
<b>Tabla 5</b> Componentes de la PCR para amplificación de CatL de <i>Trypanosoma vivax.</i> ....	36
<b>Tabla 6</b> Condiciones de la PCR para amplificación de CatL de <i>Trypanosoma vivax</i> .....	36
<b>Tabla 7</b> Cebadores de la región ITS para <i>Trypanosoma spp.</i> (Cox et al, 2005).....	37
<b>Tabla 8</b> Componentes de la PCR para amplificación de ITS de <i>Trypanosoma spp.</i> .....	37
<b>Tabla 9</b> Condiciones de la PCR para amplificación de ITS de <i>Trypanosoma spp.</i> .....	38
<b>Tabla 10</b> Distribución de <i>Trypanosoma spp.</i> en bovinos de 4 provincias del Ecuador en 2021 .....	42
<b>Tabla 11</b> Resultados de la prueba de woo y frotis sanguíneo, provincia del Napo.....	43
<b>Tabla 12</b> Pruebas parasitológicas positivas a <i>Anaplasma</i> con hematocrito inferior a 25%.....	45
<b>Tabla 13</b> Pruebas parasitológicas con hematocrito, provincia de Napo 2021. ....	46
<b>Tabla 14</b> Prueba de independencia entre la temperatura y pruebas directas (woo y frotis sanguíneo).....	49
<b>Tabla 15</b> Pruebas rápidas con temperatura superior a partir de 39.5 °C, provincia de Napo 2021.....	50
<b>Tabla 16</b> Resultados de la amplificación de fragmentos de <i>Trypanosoma spp.</i> .....	52
<b>Tabla 17</b> Componentes de la PCR para amplificación de CatL de <i>Trypanosoma vivax</i> ...	54
<b>Tabla 18</b> Distribución de <i>Trypanosoma vivax</i> en bovinos de 4 provincias del Ecuador en 2021. ....	56
<b>Tabla 19</b> Contraste de muestras positivas a <i>T. vivax</i> con datos de Hematocrito y Temperatura .....	61
<b>Tabla 20</b> Secuencias similares y homologas de la base de datos GenBank de las muestras M301 y M302 obtenidas por nested PCR de ITS.....	63

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μm</b>	Micromolar
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>BLAST</b>	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
<b>dNTP</b>	Mix de desoxinucleótidos
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>ITS</b>	Espaciadores internos transcritos
<b>Mm</b>	Milimolar
<b>NCBI</b>	Centro Nacional de Información Biotecnológica
<b>ng/μL</b>	Nanogramos por microlitro
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>TviCatL</b>	Captasina L-like de <i>Trypanosoma vivax</i>
<b>U/μL</b>	Unidades por microlitro

## RESUMEN

La tripanosomosis es una enfermedad que afecta tanto a humanos y animales, causada por el protozoario *Trypanosoma spp.*, el cual se transmite por vectores hematófagos del tipo dípteros. En bovinos, esta enfermedad es ocasionada por *Trypanosoma vivax* (subgénero *Duttonella*), genera un gran impacto económico en la productividad ganadera, debido al cuadro clínico que se presenta tras la infección, no obstante, en Ecuador se conocen pocos datos sobre su prevalencia, sintomatología clínica, pérdidas que ocasiona, etc. Es por ello, el objetivo del estudio es determinar la prevalencia en distintas poblaciones bovinas mediante las pruebas parasitológicas, woo y frotis sanguíneo, y pruebas moleculares, TviCatL-PCR específica para *T. vivax* e ITS-PCR para realizar la identificación molecular del aislado causante de la infección. El estudio se llevó a cabo en 4 poblaciones bovinas de diferentes provincias, Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas, Manabí y Napo. En este último, se encontró un brote de *T. vivax* en el que se encontró una prevalencia de 36.96% (17/46) por PCR, 19.57% (9/46) por prueba de Woo y 17,39% (8/46) por frotis. En este rebaño se reportaron, 5 muertes y tratamientos previos para *Trypanosoma spp.* En los otros 3 muestreos no se identificaron animales positivos por ninguna prueba. En este trabajo se demostró la presencia de un brote activo de *T. vivax* en el Napo, que afectó sensiblemente los animales, evidenciando hematocritos bajos, decaimiento y merma de la producción. Es por ello, que la tripanosomosis animal debe estudiarse ampliamente en Ecuador para identificar las regiones a riesgo y establecer medidas de control oportunas.

Palabras Clave:

- **TRYPANOSOMA VIVAX**
- **CATEPSINA L-LIKE**
- **TRIPANOSOMOSIS**

## ABSTRACT

Trypanosomosis is a disease that affects both humans and animals, caused by the protozoan *Trypanosoma spp.* This parasite is transmitted by hematophagous vectors of the dipteran type. In cattle, this disease is caused by *Trypanosoma vivax* (subgenus *Duttonella*), generating a great economic impact on livestock productivity, due to the clinical picture that appears after infection, however, in Ecuador few data are known about its prevalence, clinical symptomatology, treatment, losses it causes, etc. Therefore, the objective of the study is to determine the prevalence in different bovine populations by means of parasitological tests, woo and blood smear, and molecular tests, TviCatL-PCR specific for *T. vivax* and ITS-PCR for molecular identification of the species causing the infection. The study was carried out in 4 cattle populations in different provinces, Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas, Manabí and Napo. In the latter, an outbreak of *T. vivax* was found with a prevalence of 36.96% (17/46) by PCR, 19.57% (9/46) by Woo test and 17.39% (8/46) by smear test, highlighting that there was already a suspicion of an outbreak of the disease, where 5 deaths and previous treatments for *Trypanosoma spp.* had occurred previously. In this work, the presence of an active outbreak of *T. vivax* was demonstrated, which significantly affected the animals, evidencing low hematocrit, decay and decrease in production. Therefore, animal trypanosomosis should be studied extensively in Ecuador to identify the regions at risk and establish appropriate control measures.

Key words:

- **TRYPANOSOMA VIVAX**
- **CATHEPSIN L-LIKE**
- **TRYPANOSOMOSIS**

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Formulación del problema

La tripanosomosis bovina es responsable de grandes pérdidas económicas en áreas tropicales y subtropicales del mundo, esta enfermedad causada por un protozoo del género *Trypanosoma*, genera una excesiva respuesta inmunitaria inflamatoria y prolongada en el huésped tras su infección, consecuentemente se presentan desórdenes neurológicos, hematológicos y reproductivos, disfunción de la médula ósea y otros síntomas que pueden conllevar a la muerte o genera de manera crónica una relación concomitante huésped-parásito (Gonzatti, González-Baradat, M. Aso, & Reyna-Bello, 2014).

La tripanosomosis animal es causada por distintas especies, entre las de mayor importancia encontramos a *Trypanosoma congolense* (subgénero *Nannomonas*), *T. vivax* (subgénero *Duttonella*) y *T. brucei* subsp. *brucei* (subgénero *Trypanozoon*) (Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 2018), los cual se transmiten cíclicamente por las moscas de género *Glossina* en África, sin embargo, en la ausencia de dicho vector en América latina, la transmisión es de forma mecánica mediante vectores hematófagos de género *Tabanus*, *Stomoxys* y *Haematobia*, y fómite por sangre contaminada, los reportes de las especies circulantes pertenecen a *T. vivax*, *T. evansi*, asociados a infecciones crónicas y *T. theileri*, asociado a volúmenes anormales de eritrocitos (Jaimes-Dueñez et al., 2017). Esta enfermedad está asociada directamente con la pérdida de producción, por ser una de las especies más patógenas en la especie Bovinae produciendo severas manifestaciones clínicas y ocasionalmente produce la mortalidad del 3-50% de animales sin tratamiento (Magez, Pinto Torres, Oh, & Radwanska, 2021).

Se estima que la introducción de El *Trypanosoma vivax* a Latinoamérica fue en 1830 por Guyana Francesa y las Indias Occidentales Francesas, cuando realizaban importaciones de bovinos, cebú (*Bos indicus*), desde el oeste de África, Senegal (M Desquesnes, La Roque, & Peregrine, 1995).

En Ecuador, el primer reporte de *Trypanosoma spp* en bovinos se realizó por (Wells, Betancourt, & Ramirez, 1977), donde se encontró una seroprevalencia del 22,5% mediante inmunofluorescencia, después de 40 años por (Medina Naranjo et al., 2017) se reportó una prevalencia del 31,01% utilizando ELISAI, sin embargo, el ELISAI no permite discernir entre la especie que se presenta en dicha prevalencia, tras ello (Chávez-larrea, Medina-pozo, Cholota-iza, & Reyna-Bello, 2020), realizaron un reporte de la presencia de *Trypanosoma vivax* en Chone, Manabí, a partir de 20 muestras de animales, donde se identificaron 3 por TviCatL-PCR, lo que demostró la presencia en el área del hemoflagelado.

## **1.2. Justificación**

La tripanosomosis bovina es una enfermedad de interés latinoamericano, debido a las especies que circulan y su amplia distribución (Marc Desquesnes, 2004). De estos tripanosomas existentes en nuestro continente, *T. vivax* que es uno de los hemotrópicos con mayor virulencia y patogenicidad (Ramirez-Barríos et al., 2019), generando pérdidas económicas a nivel nacional, por la disminución de la producción en leche y carne, ocasionando limitación en exportaciones, además los signos clínicos son severos pueden ocasionar la muerte del hospedador. La enfermedad ocasionan severos signos clínicos como por ejemplo, alteraciones en el sistema reproductivo, pérdida de peso progresivo, daños en la capacidad de reproducción, edema submandibular, lesiones cardíacas, diarreas, abortos, signos hemorrágicos, signos neurológicos

(Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, 2018; Marc Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014).

*Trypanosoma vivax* también puede generar infecciones crónicas, además si no se lleva a cabo un correcto tratamiento para la enfermedad, esto favorece al incremento de la prevalencia en zonas afectadas, es por ello, la información de un análisis en las provincias con reportes de hemoparásitos para la determinación de la prevalencia del *T. vivax*, puede permitir conocer la epidemiología de la población muestreada, además evaluar cómo se está presentando la distribución del parásito en el Ecuador y crear estrategias de control y tratamiento para la tripanosomosis.

### **1.3. Objetivos del proyecto**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Determinar la prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos provenientes de zonas de las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Napo, Esmeraldas y Manabí, con previos reportes de enfermedades hemotrópicas.

#### **1.3.2. Objetivo específico**

Realizar muestreos en zonas de producción pecuaria con previos reportes de posible presencia de hemotrópicos.

Determinar la presencia de *Trypanosoma spp* con el método del micro capilar (Test de woo) y de frotis sanguíneos en las muestras de sangre obtenidas de los bovinos objetos de los muestreos.

Determinar la prevalencia molecularmente de *Trypanosoma vivax* en los bovinos provenientes de los muestreos.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Generalidades

La tripanosomosis animal es una enfermedad hemotrópica que afecta varios mamíferos domesticados y salvajes, este protozoario genera grandes pérdidas económicas tanto en África, Sudamérica, América Central y en ciertas áreas de Asia (Gonzatti et al., 2014). En América, la tripanosomosis bovina por *T. theileri*, no generan una sintomatología grave, sin embargo, sí pueden generar pérdidas en la producción de carne, leche e implicaciones de la salud por un efecto oportunista por parásitos gastrointestinales, plantas tóxicas u otros patógenos, mientras que la infección por *T. vivax* genera una enfermedad de mayor gravedad, ocasionando una enfermedad crónica en el bovino caracterizada principalmente por anemia y fiebre (Jaimes-Dueñez et al., 2017).

Uno de los factores de patogenicidad del *Trypanosoma spp.* es debido a la enzima trans-sialidasa, esta le permite al parásito infectar al huésped y disminuir los activadores del sistema del complemento, evadiendo los sistemas de defensa del huésped. Además de esto, los tripanosomas salivaria cuentan con una proteína de membrana, denominada glicoproteína variable de superficie (VSG), que participa en un esquema de evasión inmune, basado en la expresión de un epítipo inmunodominante capaz de variar continuamente, por lo que no induce inmunidad protectora (Mejía Tobón, 1995).

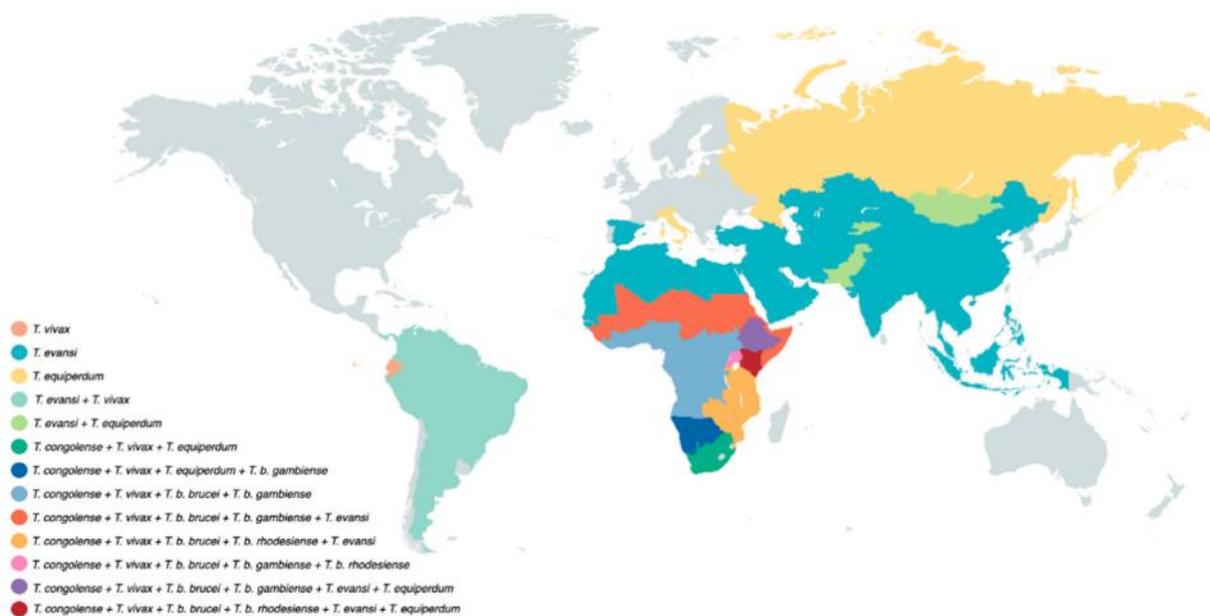
### 2.2. Distribución

La transmisión del tripanosoma en América, Asia, África y ciertas partes de Europa, se realiza por agentes de transmisión mecánicos, biológicos e iatrogénicos, dependiendo de la especie y del continente, en África estos tripanosomas son transmitidos biológicamente por

*Glossina*, mientras que en América, la tripanosomosis animal es transmitida mecánicamente por dípteros hematófagos (Marc Desquesnes, 2004). La tripanosomosis bovina en América Central y del Sur, se conoce como “secadera”, “cachera”, “huequera”, “cacho hueco”, debido a las manifestaciones clínicas que presentan los bovinos tras la infección (Gonzatti et al., 2014). Existen reportes realizados por inmunofluorescencia indirecta de *T. vivax* por Wells et al. (1977) en Paraguay y Perú con una seroprevalencia del 40% y 14.5% respectivamente, en Colombia por prueba de woo y frotis sanguíneo detectaron una prevalencia de 2.75% por (Otte, Abuabara, & Wells, 1994), además de otras especies de tripanosomas como *T. theileri* y *T. evansi*, existen otros reportes principalmente de *T. evansi* y *T. vivax* en América del Sur, incluyendo a Ecuador con el primer reporte de *T. vivax* por Chávez-Larrea et al. (2020) mediante técnica TviCatL-PCR (Figura 1).

**Figura 1**

*Distribución del Trypanosoma spp. alrededor del mundo*



### 2.3. Transmisión

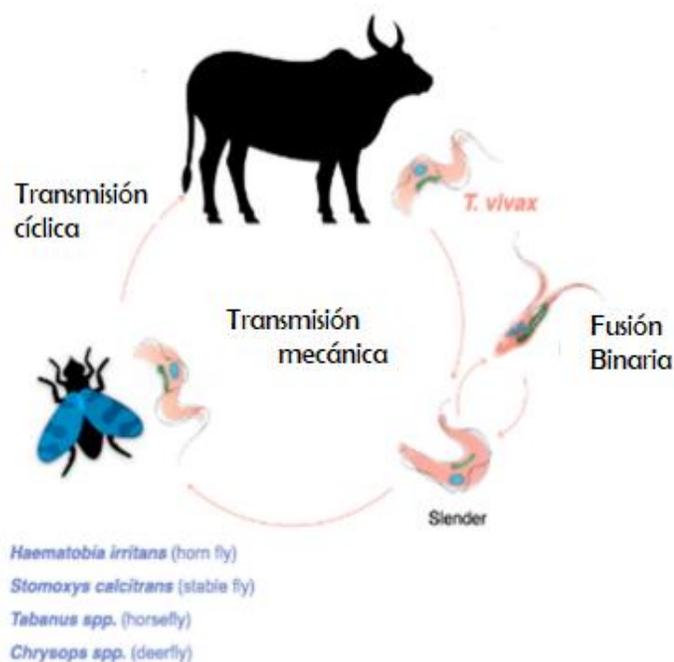
El ciclo de la vida de los tripanosomas salivarios se realiza en la mosca tsé-tsé de África, siendo el huésped definitivo del *Trypanosoma vivax*, sin embargo, en ausencia de dicho vector en América, se consideran que la transmisión es estrictamente mecánica mediante dípteros hematófagos como tábanos, *Stomoxys*, *Culicoides* y picadores del género *Haematobia* (Figura 2), de hecho, se ha demostrado experimentalmente que los tábanos en Guyana Francesa y en Colombia son transmisores mecánicos de dicha enfermedad, además de ello, también se puede presentar por transmisión iatrogénica, causada por fómite de las vacunaciones (Desquesnes, 2004; Magez et al., 2021).

En efecto, se conoce que existen cambios del genoma de *T. vivax*, en América, al compararlo con cepas de África Occidental, estos cambios están asociados al mecanismo de

transmisión y se encuentran principalmente en el ADN mitocondrial, también conocido como maxicírculos (Greif, Rodriguez, Reyna-Bello, Robello, & Alvarez-Valin, 2015).

### Figura 2

Ciclo de vida del *Trypanosoma vivax*, sus vectores mecánicos con su huésped (Magez et al., 2021).



### 2.4. Respuesta inmunitaria

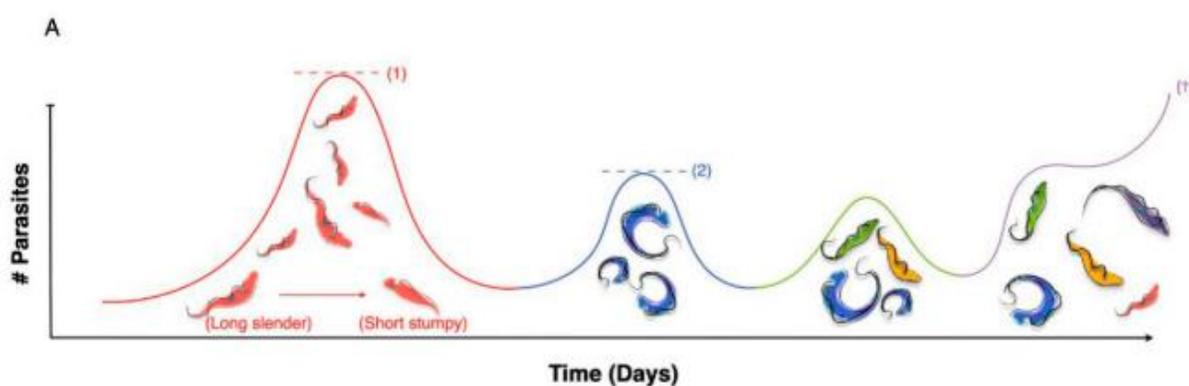
Los tripanosomas salivarios han generado distintas formas de evolución para sobrevivir en el entorno sanguíneo y linfático de mamíferos, en este nuevo ambiente, los parásitos se adaptan con el fin de evadir a la respuesta inmunológica del huésped y alcanzar una concomitancia, es decir, mantener una relación de equilibrio con el hospedador a fin de prevalecer perennemente, pero con parasitemias muy bajas (Magez et al., 2021).

Para lograr esto, *Trypanosoma vivax* cuentan en su superficie con una glicoproteína variable superficie (VSG), la cual está encargada de la variación antigénica con el fin de evadir el

sistema inmunológico del hospedador, dichos cambios se generan cientos de veces obteniendo una gran variedad de VSG convirtiéndose en un fuerte inmunógeno pero sin conferir protección heteróloga, es por ello, que los anticuerpos eliminan los clones de la VSG dominantes, sin embargo la VSG se reemplazan y los anticuerpos preformados pierden su avidéz por la nueva VSG, escapándose así el parásito del sistema inmune (Pereira et al., 2020).

### Figura 3

*Ondas de parasitemia por la variación antigénica de su capa superficial*



*Figura:* (1) La parasitemia es alta hasta alcanzar el quorum sensing, los parásitos inician la expresión de la nueva capa de VSG, que generalmente da lugar a varias infecciones de pico bajo. (2) Las ondas de parasitemia suelen estar compuesta por múltiples variantes de VSG que ocurren al mismo tiempo, esto conlleva a el agotamiento del sistema inmunológico (Magez et al., 2021).

La variación de la VSG permite que se presenten diferentes fluctuaciones en el nivel de parasitemia, donde el primer pico de parasitemia alcanza al *quorum sensing* e inmediatamente inicia la defensa por el sistema inmunológico reduciendo la parasitemia, los parásitos luego generan nuevas VSG y logran colonizar nuevamente la sangre y así sucesivamente. Así tenemos entonces que, en el transcurso de la infección, se presentan distintos niveles de parasitemia constituidas de múltiples variantes de la VSG. Debido a que las múltiples variantes de los parásitos

circulantes sufren la misma variación en su recubierta, el hospedador va presenta una pérdida de control del sistema inmunológico por agotamiento, generando la muerte del individuo, caso contrario el hospedador genera una relación concomitante convirtiéndose en un reservorio de *Trypanosoma spp.* (Magez et al., 2021).

### **2.5. *Trypanosoma vivax***

La introducción del *T. vivax* en el continente americano se remonta al año 1830 por una importación de ganado cebú en Guyana Francesa a partir de África occidental, Senegal (Gonzatti et al., 2014).

Evolutivamente los maxi y minicírculos mitocondriales evidencian que *T. vivax* es un grupo monofilético, que surgen por un ancestro en común y, además que las cepas circulantes en América provienen de una única incursión desde África (Greif et al., 2015).

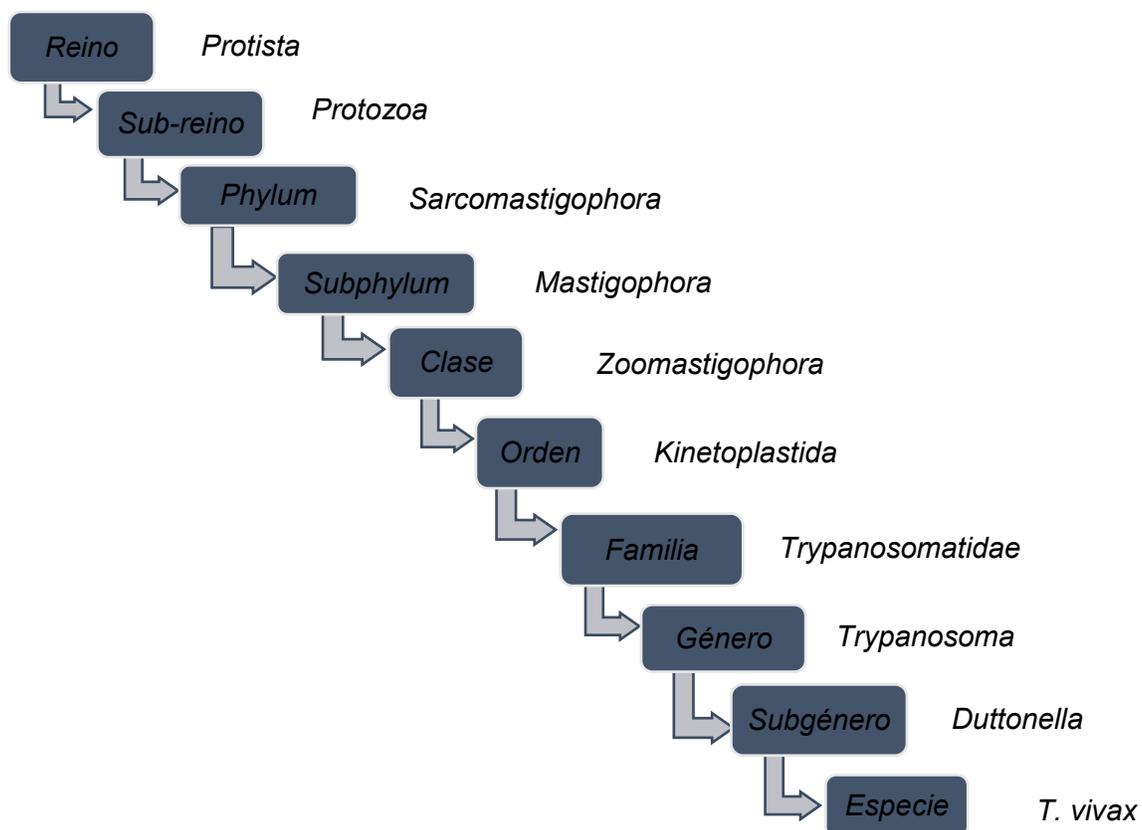
*Trypanosoma vivax* es considerado una especie extracelular que circulan en el torrente sanguíneo y causa severos daños en los animales ungulados, estos parásitos a su vez pueden invadir fluido cerebroespinal y también se puede encontrar en espacios intravascular del hospedador, por lo cual, en ciertas ocasiones, invade el sistema nervioso central durante los estados de alta parasitemia. Mediante infecciones experimentales realizadas, se han evidenciado los síntomas que pueden variar desde fiebre, anorexia, pérdida de peso, reducción de la producción de leche, incremento del tamaño de nodos linfáticos, abortos, diarrea y también una anemia con leucopenia o leucocitosis (Fidelis Junior et al., 2016; Parra-Gimenez & Reyna-bello, 2019).

### **2.6. Taxonomía**

La clasificación taxonómica del *Trypanosoma vivax* es la siguiente (Desquesnes, 2004):

**Figura 4**

*Clasificación taxonómica del Trypanosoma vivax (Desquesnes, 2004)*



### 2.7. Morfología

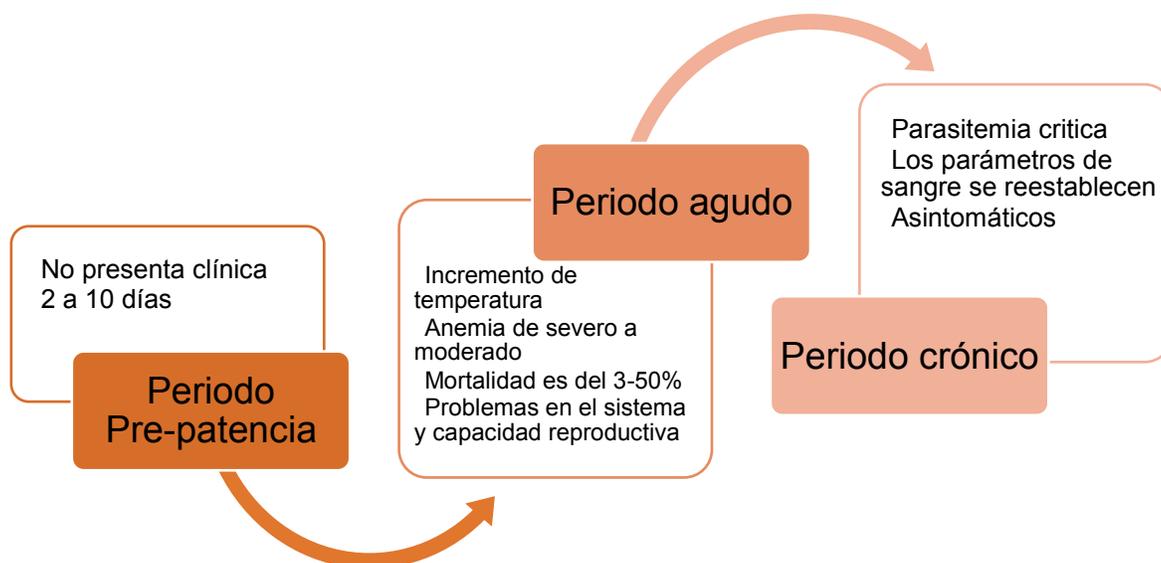
El tamaño del *T. vivax* puede variar desde 16 a 30  $\mu\text{m}$ , cuenta con un flagelo libre de 7  $\mu\text{m}$ , una membrana ondulada y se distingue por tener un kinetoplasto grande de 1  $\mu\text{m}$ , redondeado y terminal, se lo puede encontrar en formas delgadas del parásito, sin embargo, también existen parásitos con una morfología variable (Desquesnes, 2004)

## 2.8. Signos clínicos

La tripanosomosis genera signos clínicos en que se presentan en la Figura 5, en las cuales se observa principalmente anemia, fiebre, pérdida progresiva de peso, disminución de la producción, alteraciones en el sistema reproductivo, tumefacción en los nodos linfáticos, incluso, hasta llevarlo a la muerte (Marc Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014).

**Figura 5**

*Periodos de signos clínicos y patogenicidad de la tripanosomosis bovina.*



Los cuadros clínicos se presentan en 3 periodos: Periodo pre-patente, en el cual inicia con la transmisión del parásito por el vector, hasta que se detectan en la sangre del bovino los parásitos sin presentar sintomatología clínica. Este periodo puede durar de 2 a 10 días tras la infección, sin embargo el periodo depende de la carga parasitaria de inoculación en el bovino y de la virulencia del aislado (Gonzatti et al., 2014).

El periodo agudo, se presenta la sintomatología clínica típica de la enfermedad y dura de 2 a 3 meses en los cuales se observan fluctuaciones en la temperatura llegando a alcanzar los 41 °C, se hace presente la anemia de severa a moderada originando una disminución de la disponibilidad de energía para el hospedador, además la liberación de TNF- $\alpha$  interfiere con la disponibilidad de sustratos energéticos en el huésped, en este periodo sin tratamiento del 3 al 50% de los animales pueden morir, dependiendo de la cepa y/o de la condición corporal del animal, genética, etc (Fidelis Junior et al., 2016; Gonzatti et al., 2014; Ramirez-Barrios et al., 2019)

Periodo crónico, los animales que sobrellevaron el periodo agudo, comienzan a recuperar los parámetros clínicos y se convierten en asintomáticos, sin embargo, debido a el estrés, puede reaparecer la parasitemia, el hospedador pierde la inmunidad concomitante y genera la reaparición de los síntomas clínicos del periodo agudo (Gonzatti et al, 2014).

## **2.9. Tratamiento y control**

Debido a que la enfermedad se presenta en brote esporádicos en América Latina, los grandes productores cuentan con un control y supervisión mediante tratamientos preventivos, lo cuales depende de la geografía en la que se presenta el brote. Los dos medicamentos más comunes para el tratamiento de la tripanosomosis bovina por *T. vivax* son aceturato de diminazeno (Babenil<sup>®</sup>, Diminazene-A) y el cloruro de isometamidium (Trypamidium<sup>®</sup>), utilizados hace más de 50 años, no obstante, con el tiempo se ha encontrado farmacoresistencia en cierto aislados por el uso indiscriminado de estos medicamentos (Gonzatti et al., 2014).

**Tabla 1**

*Tratamientos empleados para la tripanosomosis en América Latina (Gonzatti et al., 2014)*

<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis</b>	<b>Modo de acción</b>
<b>Aceturato de diminazeno</b>	3,3 a 7 mg / kg	Bloquea la replicación del K-ADN y la síntesis de poliaminas.
<b>Cloruro de isometamidium</b>	1 mg / kg	El fármaco se acumula en el kinetoplasto impidiendo que realice su mecanismo de acción evitando la replicación.

#### **2.10. Características moleculares**

*Trypanosoma vivax* tiene 41775 kbp aproximadamente en su genoma, que codifican 11870 genes de distintas proteínas, posee un kinetoplasto que contiene ADN mitocondrial (K-ADN) y está ubicado en la matriz mitocondrial, este contiene ADN con estructuras circulares, que son conocidos como minicírculos y maxicírculos de los cuales lo más pequeños son de 465 bp (Gonzatti et al., 2014).

#### **2.11. Métodos de diagnóstico**

Los métodos de diagnóstico permiten identificar al agente causal de la enfermedad, con el fin de realizar un tratamiento específico. Para las enfermedades hemotrópicas, esta descrito que los síntomas suelen ser inespecíficos, por lo cual es necesario utilizar métodos directos y moleculares para su diagnóstico (OIE Terrestrial Manual, 2008).

### **2.11.1. Métodos directos**

Los métodos de diagnóstico directos son altamente específicos, sin embargo, carecen de sensibilidad al tratarse del diagnóstico de la tripanosomosis, debido a la fluctuación que presenta la parasitemia y de la cantidad de sangre analizada. Entre estas pruebas se encuentra el frotis, gota fresca y la prueba de Woo (OIE Terrestrial Manual, 2008).

#### **2.11.1.1. Prueba de woo**

Es una técnica conocida como centrifugación por micro hematocrito, o el método Woo, es utilizada para el diagnóstico de tripanosomosis animal, la cual consiste en la separación de los diferentes componentes formes de la muestra de sangre en un capilar en función de su gravedad especifican y la observación posteriormente al microscopio de la frontera entre plasma y glóbulos blancos (OIE Terrestrial Manual, 2008).

Durante las infecciones de *T. vivax*, la sensibilidad en el método de Woo se puede acercar al 100% dependiendo de si la parasitemia es mayor a 700 tripanosomas por mL de sangre, la sensibilidad disminuye al 50%, sí la parasitemia se encuentra entre 60 y 300 tripanosomas por mL de sangre y es difícil detectar cuando la parasitemia es inferior a 60 tripanosomas por mL de sangre (OIE Terrestrial Manual, 2008).

### **2.11.2. Métodos moleculares**

Los métodos moleculares para el diagnóstico, tienen una alta sensibilidad analítica y depende de las condiciones de reacción y los primers para su especificad, en el diagnóstico de la tripanosomosis la prueba molecular cuenta con mayor sensibilidad que las técnicas directas como la centrifugación del hematocrito (prueba de woo) o los frotis sanguíneos (Gonzatti et al., 2014)

## Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

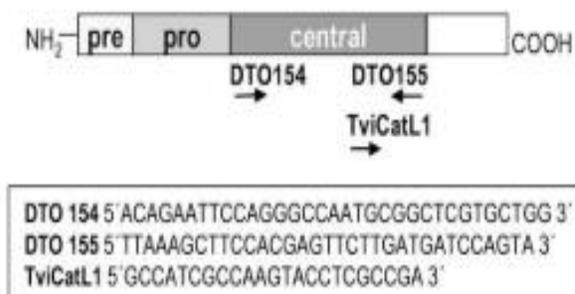
La PCR es una herramienta para el diagnóstico que permite amplificar secuencias específicas del ADN nuclear, la técnica a mejorado la sensibilidad y precisión en el diagnóstico de la tripanosomosis, la sensibilidad de la PCR va aumentando hasta alcanzar que el nivel de parasitemia se presente de 1 tripanosoma por mL de sangre, además permite diferenciar entre especies y subespecies, utilizando los primers específicos (Gonzatti et al., 2014).

## PCR para la amplificación de la Captetina L-like (TviCatL-PCR)

Las copias del gen de Captetina L (CatL) varía según la especie de tripanosoma, lo cual permite un diagnóstico sensible y específico, esta proteasa se caracteriza por tener un dominio catalítico, ligado a la actividad enzimática, por lo que es conservado estructuralmente y funcionalmente (Cortez et al., 2009).

### Figura 6

*Gen de captetina L-like y primers para la amplificación*



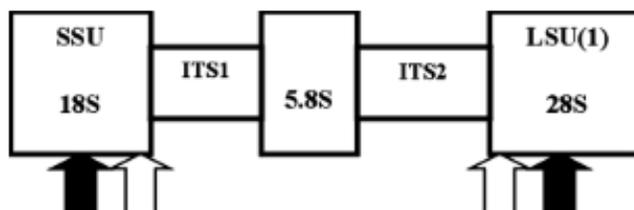
*Figura:* El gen de captetina L-like y los primers empleados en la amplificación de la secuencia del dominio catalítico de *Trypanosoma spp* con los primers DTO154 Y DTO155 y de *T. vivax* con el primer TviCatL1 Y DTO155 (Cortez et al., 2009).

### PCR para la amplificación de los ITS del ADNr

La PCR realizada para la región del espaciador interno transcrito del rDNA, es una de las técnicas universales para el diagnóstico del tripanosoma, debido a las regiones flanqueantes altamente conservadas y la variabilidad del tamaño entre las especies y subespecies de tripanosomas. En un estudio por (Cox et al., 2005), se utilizaron los primers de las regiones de ITS, en una PCR anidada, con dos rondas, de las cuales se amplifica toda la región del 18s con primers internos (ITS3 e ITS4) y primers externos (ITS1 e ITS2). La desventaja de esta técnica son los altos costos y la complicación del uso de la herramienta (Gonzatti et al., 2014).

#### Figura 7

*Región del espaciador interno transcrito del rDNA y primers para su amplificación*



*Figura:* Los recuadros grandes representan regiones de codificación conservadas (SSU, subunidad pequeña; LSU, subunidad grande) y los recuadros pequeños representan regiones espaciadoras. Los primers anidados diseñados para las regiones conservadas están representados por flechas negras (cebadores externos) ITS1 e ITS2 y flechas blancas (cebadores internos) ITS3 e ITS4.

## CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Toma de muestra de sangre

Se tomaron 135 muestras de sangre venosa de bovinos de la zona de faenamiento de Santo Domingo, en la EP Mancomunada Trópico Húmeda de Santo Domingo de los Tsáchilas, en 3 muestreo realizados en distintas fechas. En la provincia de Esmeraldas, Atacames, a través de un convenio con Agrocalidad, se obtuvieron 26 muestras de un predio sospechoso a hemotrópicos. En la provincia de Napo, Chontapunta, se recolectaron 46 muestras de 2 predios sospechosos de *T. vivax* donde previamente se reportó por Agrocalidad la presencia de *Trypanosoma spp.* En la provincia de Manabí, Calceta en una zona con previos reportes de hemotrópicos, se recolectaron 192 muestras de 6 predios con la colaboración de Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí.

Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE sede Santo Domingo para su procesamiento, sin embargo, las pruebas rápidas se realizaron en laboratorios móviles *in situ*.

### 3.2. Procesamiento de extracción de sangre periférica

El proceso de extracción se lo realizó mediante dos métodos, en la zona de faenamiento de la sala de matanza, se recolecto la sangre durante el desangrado, mientras que en los predios muestreados, se realizó la recolección por venopunción coccígea, la cual consiste en inmovilizar al bovino, manteniéndolo de pie, limpiar el área perianal y ubicar la vena coccígea en la zona ventral y media de la base de la cola, entre las vértebras coxígeas 6 y 7, tomar directamente de la vena con la aguja calibre 21, camisa (capuchón) y vacutainer, introduciendo la aguja entre 8-12mm de profundidad, en tubos con presencia de EDTA (Agrocalidad, 2018).

### 3.3. Determinación del hematocrito

Se procedió a llenar un capilar con la muestra de sangre con EDTA en un 75%, se selló con plastilina uno de los lados y se centrifugó por 3 minutos a 10.000 xg, luego, utilizando la carta de hematocrito se procedió a determinar los niveles de glóbulos rojos en cada muestra de los bovinos.

### 3.4. Tinción de frotis sanguíneos

A partir de la sangre con EDTA se colocó en un portaobjeto 5  $\mu$ L de sangre y con la ayuda de otro portaobjeto se colocó sobre la sangre con una inclinación de 45° y se extendió homogéneamente por el portaobjeto, al secarse se procedió a colocar metanol por 5 minutos, al secar ese, se colocó giemsa (1/20) de 25 min, luego se procedió a lavar y cuando los frotis estaban secos, se observó en el microscopio a 100x.

### 3.5. Extracción de ADN total

La extracción de ADN total de sangre se llevó a cabo a partir de la sangre con anticoagulante con empleando el protocolo obtenido del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado de Riera, Rojas, & Zapata., (2010), y además se utilizó otro método de extracción descrito por Sambrook & Russell, (2001).

#### Tabla 2

Protocolo para la extracción de sangre de bovino del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado de Riera et al. (2010)

Pasos	Procedimiento	Cantidad	Durante
1.	Transferir de sangre con EDTA en un vial de 1,5 $\mu$ L.	500 $\mu$ L	
2.	Añadir de Buffer GR (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], Tritón X-100 1% y sacarosa 600 Mm) y homogenizar rápidamente (vórtex).	540 $\mu$ L	1 min

Pasos	Procedimiento	Cantidad	Durante
3.	Centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.		
4.	Repetir los pasos 2 y 3 hasta tres veces.		
5.	Añadir de buffer GB (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], NaCl 400 mM y EDTA 2 mM).	180 µL	
6.	Añadir de proteínas acá en buffer PK (20 mg/mL).	20 µL	
7.	Añadir de SDS al 20% y homogenizar rápidamente (vórtex).	6 µL	1 min
8.	Incubar a 56 °C durante 2 horas y agitación de 1000 rpm. Y dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.		
9.	Añadir de AcK (acetato de potasio) 3M y homogenizar suavemente invirtiendo el vial.	90 µL	
10.	Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante.		
11.	Repetir los pasos 9 y 10.		
12.	Añadir de etanol absoluto (-20 °C) e incubar a -20 °C.	600 µL	Overnight
13.	Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.		
14.	Lavar el pellet con etanol al 70%.	100 µL	
15.	Centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.		
16.	Dejar secar el pellet a 37 °C.		
17.	Re-suspender en Buffer TE e incubar a temperatura ambiente.	50 µL	20 min
18.	Almacenar -20 °C hasta su amplificación.		

### 3.6. Determinación de Calidad de ADN

La calidad del ADN extraído se evidenció mediante una corrida electroforética, a una concentración de agarosa al 0.8% (p/v) y usando como intercalante del ADN bromuro de etidio 1/10.000, en cada pocillo se colocó la mezcla de Blue Juice 10x 1:1 con 3 µL de ADN, añadiendo además 5 µL de marcador 1KB en uno de los pocillos. La corrida se realizó a 100 voltios por 30-45 minutos y finalmente se evidenciaron las bandas del gel mediante exposición a UV.

### 3.7. PCR para detección de *Trypanosoma spp.*

Para la detección de *Trypanosoma spp.* se amplificó el gen de dominios catalíticos de las enzimas Catepsina L (CATL) de tripanosoma, utilizando los primers DTO 154 (5'-ACA GAA TTC CAG GGC CAA TGC GGC TCG TGC TGG- 3') y DTO 155 (5'- TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT CCA GTA-

3') y las condiciones establecidos de los componentes en la Tabla 3 y de amplificación por PCR en la Tabla 4 con un volumen final de 25  $\mu$ L, siguiendo el protocolo inicial descrito por Cortez et al., (2009) con pequeñas modificaciones.

**Tabla 3**

Componentes de la PCR para amplificación de CatL de *Trypanosoma spp.*

Reactivos	Concentración Final	Volumen ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O		-
Buffer	1.00	2.50
P.DTO154	0.50 $\mu$ M	1.25
P. DTO155	0.50 $\mu$ M	1.25
MgSO <sub>4</sub>	1.50 mM	0.00
DNTPs	0.80 mM	0.50
Taq	1.00 U/ $\mu$ L	0.20
ADN	100 ng/ $\mu$ L	1
<b>Volumen Total</b>		<b>25.00</b>

**Tabla 4**

Condiciones de la PCR para amplificación de CatL de *Trypanosoma spp.*

Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	62	30 s	35
Extensión	72	1min	
Extensión final	72	10 min	1
Mantenimiento	4	$\infty$	-

*Nota:* El producto de PCR se identificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 100 voltios durante 45 minutos, se utilizó un plásmido con el gen de Captetina L como control positivo y un marcador molecular de 1Kb.

### 3.8. PCR para detección de *Trypanosoma vivax*

Para la detección de *Trypanosoma vivax* se amplificó el gen de dominios catalíticos de enzimas de Catepsina L (CATL) del tripanosoma, utilizando los primers TviCatL1 (5'-GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA - 3') Y DTO 155 (5'- TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT CCA GTA- 3') y las condiciones establecidas en la Tabla 5 y de amplificación por PCR en la Tabla 6, con un volumen final de 25  $\mu$ L, según lo descrito por Cortez et al., (2009) con pequeñas modificaciones.

**Tabla 5**

Componentes de la PCR para amplificación de CatL de *Trypanosoma vivax*.

Reactivos	Concentración Final	Volumen ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O		-
Buffer	1.00	2.50
TviCatL	0.50 $\mu$ M	2.50
DTO155	0.50 $\mu$ M	2.50
MgSO <sub>4</sub>	1.50 Mm	0.00
DNTPs	0.80 Mm	0.50
Taq	2.5 U/ $\mu$ L	0.25
ADN	100 ng	2
<b>Volumen Total</b>		<b>25.00</b>

**Tabla 6**

Condiciones de la PCR para amplificación de CatL de *Trypanosoma vivax*

Proceso	Temperatura °C	Tiempo	Ciclo
Desnaturalización inicial	94	5 min	1
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	65	30 s	35
Extensión	72	1min	
Extensión final	72	10 min	1
Mantenimiento	4	$\infty$	-

*Nota:* El producto de PCR se identificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 100 voltios durante 45 minutos, se utilizó un plásmido con el gen de Captosina L como control positivo y un marcador molecular de 1Kb.

### 3.9. PCR para detección de ITS

Para la detección de los espaciadores internos transcritos (ITS), permitiendo determinar por el tamaño del fragmento obtenido la especie a la que pertenece el *Trypanosoma spp*, los primer utilizados se presentan en la tabla 7 y las condiciones establecidas de los componentes en la Tabla 8 y de amplificación por PCR en la Tabla 9 con un volumen final de 25  $\mu$ L, según el protocolo descrito por Cox et al., (2005) con algunas modificaciones.

**Tabla 7**

Cebadores de la región ITS para *Trypanosoma spp*. (Cox et al, 2005).

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

**Tabla 8**

Componentes de la PCR para amplificación de ITS de *Trypanosoma spp*.

Reactivos	Concentración Final	Volumen ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O		-
Buffer	1.00	2.50
ITS 1/3	1.00 $\mu$ M	2.50
ITS 2/4	1.00 $\mu$ M	2.50
MgSO <sub>4</sub>	1.50 Mm	0.00
DNTPs	0.80 Mm	0.50
Taq	1.25 U/ $\mu$ L	0.25
ADN	100 ng	1
<b>Volumen Total</b>		<b>25.00</b>

**Tabla 9**

Condiciones de la PCR para amplificación de ITS de *Trypanosoma spp.*

Proceso	Temperatura °C	Tiempo (min)	Ciclo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95	7	1
<b>Desnaturalización</b>	94	1	
<b>Hibridación</b>	55	1	35
<b>Extensión</b>	72	2	
<b>Extensión final</b>	72	10	1
<b>Mantenimiento</b>	4	∞	-

*Nota:* El producto de PCR se identificó por electroforesis en un gel de agarosa al 2% a 100 voltios duran 45 minutos, se utilizó como control positivo un plásmido con un fragmento de *T. theileri* y un marcador molecular de Kb.

### 3.10. Secuenciación

El proceso se llevó a cabo en la empresa de MacroGen® Corea, mediante la técnica de Sanger, para la secuenciación de los productos PCR, se envió 15 µL de cada uno. Los primers utilizados como ITS3 y ITS4, fueron enviados en una concentración de 10 µM y 10 µL por cada reacción.

### 3.11. Ensamblaje de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y Slap gene, se observó la calidad en los picos de la cromatografía de la secuencia y se procedió a observar el tamaño del fragmento, se limpiaron los extremos de la secuencia y se guardaron en formato fasta.

### **3.12. Análisis de similitud y homología**

El análisis de similitud y homología se realizó en la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) con la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para nucleótidos, este programa permitió comparar las secuencias para determinar la especie de tripanosoma que presentan similitud en la secuencia.

### **3.13. Análisis estadístico**

#### **3.13.1. Diseño no experimental**

Es aplicado cuando no se realiza una manipulación deliberada en las variables analizadas, en su lugar, se toma en cuenta la observación del fenómeno y se recolecta los datos, con el propósito de describir las variables e incidencia en un momento determinado.

#### **3.13.2. Variable de respuesta**

Es el resultado obtenido del muestreo que pueden estar correlacionada o influenciada por otros factores, dicha medición también se la determina como una variable dependiente.

#### **3.13.3. Análisis**

El análisis del estudio se llevó a cabo en el software estadístico de SPSS, Excel y R Studio.

#### **3.13.4. Estadística descriptiva**

Se realizó mediante el análisis de los datos generados en los diagnósticos en el laboratorio (pruebas parasitológicas y PCR) y registro del muestreo, en las cuales permite ordenar los datos, obtener tablas y gráficos, obtener medidas de tendencia y frecuencia, en cada conjunto de las muestras por provincia.

### **3.13.5. Datos de prevalencia**

Es una medida determinada por el número de casos positivos a cierta afección en un momento específico en relación con el número total del muestreo realizado. La prevalencia se determinó utilizando los resultados de las pruebas parasitológicas y de la PCR, en la cual la prevalencia se determinó, mediante el número de caso positivos a *T. vivax* en relación al número total de bovinos muestreado en la población determinada.

### **3.13.6. Estadística inferencial**

Permite realizar estimaciones de parámetros poblacionales a partir de la muestra, con el fin de contrastar hipótesis. Con los datos obtenidos en el muestreo, se procedió a realizar las pruebas de T Student para variables paramétricas, prueba de Chi-cuadrado y Test de Fisher para variables no paramétricas, con el fin de determinar independencia entre dos factores, además, dependiendo del tipo del tamaño de la muestra para el análisis, se aplicó Fisher o Chi-cuadrado, además, se realizó la prueba de hipótesis para evitar los tipos de errores en la estadística.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Pruebas parasitológicas (Woo y frotis sanguíneo)

Los resultados de las pruebas parasitológicas realizadas, permitió determinar el hematocrito y parasitemia, por la prueba de woo y frotis sanguíneos en cada una de las provincias (Tabla 10), en estas pruebas se evidenció solo una muestra positiva por la prueba de woo en la provincia de Santo Domingo. Dada las características de su morfología permitió evidenciar la presencia de un *Megatrypanum spp.* por su gran tamaño. Este protozoario puede presentar un tamaño de alrededor 60 – 70  $\mu\text{m}$  hasta los 120  $\mu\text{m}$ , en América Latina se ha reportado evidencia de la presencia de la especie *Trypanosoma theileri* perteneciente al subgénero *Megatrypanum* (Desquesnes, 2004; OIE Terrestrial Manual, 2008).

En la provincia de Napo, se encontró mediante la prueba de woo, 9 muestras positivas a *Trypanosoma spp* determinadas por las características morfológicas de su tamaño pequeño y desplazamiento en la capa leucocítica del capilar (Gonzatti et al., 2014), representando el 19,57% (9/46) de positivos a *Trypanosoma spp.* del muestreo, esta prueba permitió además establecer niveles de parasitemia por observación (Tabla 10). Debido a que el método de woo cuenta con una baja sensibilidad durante los períodos crónicos de la enfermedad, permitió evidenciar el estado agudo de los animales muestreados al tener parasitemia superior a los  $10^3$  tripanosomas por mL de sangre, donde la sensibilidad de la prueba puede alcanzar el 100% (Gonzatti et al., 2014; OIE Terrestrial Manual, 2008).

Con el fin de determinar la especie del tripanosoma que provocó el brote, se realizó un frotis sanguíneos, donde se pudo evidenciar con mayor especificidad la morfología de los tripanosomas presentes en las muestras, se observó que el tamaño era de aproximado 22 – 27  $\mu\text{m}$ , el kinetoplasto grande y prominente, núcleo definido, membrana ondulante y flagelo,

terminal y libre, de manera que se determinó que el protozoo pertenecía a la especie de *T. vivax* ( Figura 9) (Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014), mientras que en las provincias de Manabí y Esmeraldas no se encontró muestras positivas a *Trypanosoma spp.*, además, además, los frotis sanguíneo permitieron evidenciar la presencia de cuerpos intra eritrocitos compatibles con *Anaplasma marginale* en varios animales de distintas provincias (Tabla 12).

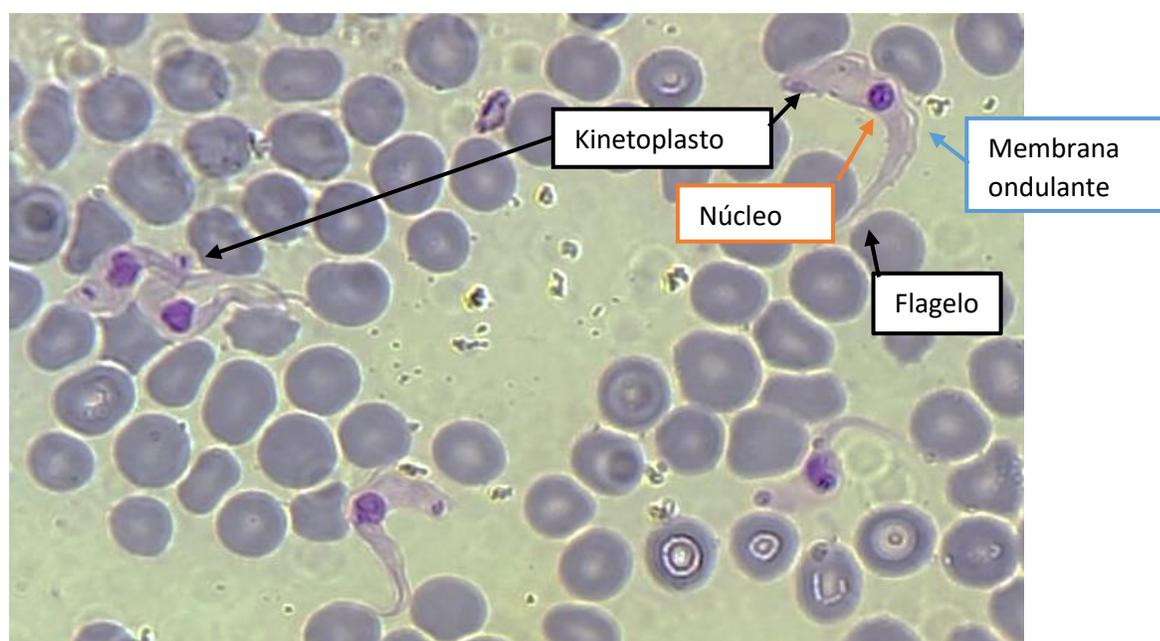
**Tabla 10**

Distribución de *Trypanosoma spp.* en bovinos de 4 provincias del Ecuador en 2021

Provincias	Animales muestreados	Woo		Frotis	
		(n)	%	(n)	%
Santo Domingo	135	1	0.74	0	0.00
Esmeraldas	26	0	0.00	0	0.00
Napo	46	9	19.57	8	17.39
Manabí	192	0	0.00	0	0.00
<b>Total</b>	<b>399</b>	<b>10</b>	<b>20.31</b>	<b>8</b>	<b>17.39</b>

**Figura 8**

Morfología del *T. vivax* encontrado en los frotis sanguíneos de las muestras de Napo, 2021



*Nota:* Tinción con giemsa, se observan 6 *Trypanosomas vivax* y los glóbulos rojos.

**Tabla 11**

Resultados de la prueba de woo y frotis sanguíneo, provincia del Napo.

<b>COD. LAB.</b>	<b>Hematocrito</b>	<b>Temp °C</b>	<b>Woo</b>	<b>Frotis</b>
<b>2021-017</b>	41	-	+*	
<b>2021-211</b>	30	37	+++	
<b>2021-212</b>	27,5	39,5	-	<i>Trypanosoma vivax</i> ++
<b>2021-214</b>	28	39,3	+++++	Linfocitosis, <i>T. vivax</i> +
<b>2021-215</b>	29	40	+	Eosinofilia, <i>T. vivax</i> ++++
<b>2021-218</b>	31	39,8	-	Anaplasma 1/10 000
<b>2021-219</b>	29	39,2	-	
<b>2021-220</b>	29	40,4	-	Anaplasma 1/10 000
<b>2021-222</b>	31	39,8	+	Eosinofilia, <i>T. vivax</i> ++++
<b>2021-225</b>	27	39,6	+	<i>Trypanosoma vivax</i> ++++
<b>2021-226</b>	36	39,4	-	Anaplasma 1/1 000
<b>2021-227</b>	32	39,3	-	Eosinofilia
<b>2021-228</b>	34	39,4	+++	
<b>2021-231</b>	27	-	++	<i>Trypanosoma vivax</i> +
<b>2021-236</b>	29	39,4	+++	<i>Trypanosoma vivax</i> +++
<b>2021-239</b>	28	39,9	+	<i>Trypanosoma vivax</i> +

*Nota:* (+\*) muestra de la sala de matanza de Santo Domingo, con morfología de *T. theileri*. (+) muestras positivas en la prueba de Woo y frotis, la cantidad de + es una cuantificación de la cantidad de parasitemia en la muestra de sangre, además se observó diferentes niveles de glóbulos blancos.

#### 4.2. Hematocrito

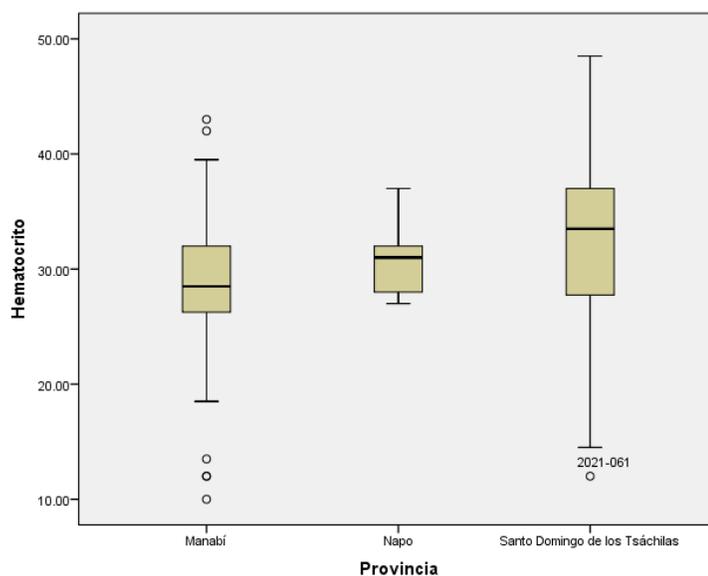
La anemia es parte de la sintomatología presente en infecciones con *T. vivax* y depende de la virulencia y patogenicidad de la cepa (Ramirez-Barrios et al., 2019), por por esto, fue determinada en cada uno de los animales de la población bovina de Napo, considerando como animal anémico al bovino con un hematocrito inferior al 25% (Radostits, Gay, Blood, & Hinchcliff, 2002). La media del hematocrito obtenido del muestreo en Santo Domingo de los Tsáchilas es de 32.89 %, donde la distribución central se encuentra en el rango de 26 - 46 % correspondiente a valores hematológicos normales

La distribución de la población con referencia al hematocrito (Hto) se encontró el 14.07% (19/135) de bovinos con Hto inferiores a 25% (Tabla 12). Sin embargo, la causa de esto, es muy difícil determinar, pudiendo ser un grupo de factores como babesia, anaplasma u otra enfermedad anemizante, así como igualmente puede deberse a problemas nutricionales (Radistits et al., 2005). Los resultados de anaplasmosis en Santo Domingo de los Tsáchilas es del 22.22% (30/135) de la población muestreada. No obstante, no se encontró una relación estadística mediante t de student entre el porcentaje de hematocrito con presencia o ausencia de la anaplasmosis, en dicha población también se encontró un caso con *T. theileri* por prueba de woo, que se asocia con niveles bajos de eritrocitos en la sangre (Jaimes-Dueñez et al., 2017) siendo necesario un estudio de la asociación con otro hemotrópicos.

En el caso de los hematocritos elevados se encontró 4.44% (6/135) de bovinos, la causa posible es la deshidratación del animal, considerando que estos animales son de faenamiento y por ello, posiblemente no consumieron agua en los últimos días (Figura 10).

### Figura 9

*Distribución de los niveles de hematocrito por provincias.*



En la provincia de Manabí, se obtuvo una distribución central entre los 35 – 27 %, con una media de 28.75 % de valores de hematocrito, aunque se encontró 11.98% (23/192) animales con hematocritos por debajo de 25%, mediante frotis sanguíneos se pudo constatar la presencia de la anaplasmosis en bovinos en algunos animales los analizadas *in situ* de 2.60% (5/192), lo cual podría ser causante de la anemia (Tabla 12).

La anaplasmosis es una enfermedad anemizante debido a que la bacteria invade los glóbulos rojos generando cambios estructurales y bioquímicos en la membrana, originando un proceso autoinmune con eritrofagocitosis extravascular (Carlyon & Fikrig, 2003).

**Tabla 12**

*Pruebas parasitológicas positivas a Anaplasma con hematocrito inferior a 25%.*

<b>COD. LAB.</b>	<b>Hematocrito (%)</b>	<b>Woo</b>	<b>Frotis</b>	<b>Provincia</b>	<b>Prevalencia del muestreo</b>
2021-049	7	-	Eosinofilo, Neutropenia, Anaplasma 1/10 000	Santo Domingo de los Tsáchilas	22.22%
2021-058	25.5	-	Eosinofilo, Anaplasma 1/10 000		
2021-080	17	-	Anaplasma 1/10 000		
2021-095	21.5	-	Anaplasma 1/10 000		
2021-107	23.5	-	Anaplasma 1/10 000	Manabí	2.60%
2021-393	21	-	Anaplasma		
2021-398	10	-	Anaplasma		
2021-399	12	-	Anaplasma		
2021-401	12	-	Anaplasma		

*Nota:* En la provincia de Manabí, se realizó por frotis y gota fresca de sangre, por la alta parasitemia.

En la provincia de Napo se evidencio una distribución central entre 32 – 28% y una media de 30.74 % de hematocrito sin encontrar ningún animal con anemia, pero se encontraron valores bajos de hematocrito (Figura 11: Tabla 13), en dicha provincia, se encontró presencia de *Trypanosoma spp*, sin embargo, los bovinos fueron tratados con diversas drogas previamente al

muestreo debido a 5 muertes anteriores en dicha finca, al momento de administrar una droga la sintomatología clínica empieza a desaparecer por la reducción del parásitos en el hospedador, no obstante, no se conoce los mecanismos de resistencia debido que tras un semana se presentó un rebrote en el cual se realizó el muestreo de los animales, se puede agregar a su vez el desconocimiento de la patogenicidad y virulencia del aislado, que se asocia con los signos clínicos del hospedador (Boada-sucre, Rossi Spadafora, Tavares-marques, Finol, & Reyna-bello, 2016; M Desquesnes et al., 1995; Gonzatti et al., 2014).

Los hematocritos bajos en la infección por *Trypanosoma spp.* debido al estado agudo de la enfermedad y a la cepa circulante, en la cual el tripanosoma secreta/excreta sialidasa contribuyendo a la eritrofagocitosis. De igual manera, los parásitos pueden originar daños físicos a los eritrocitos, induciendo así su fagocitosis (Boada-sucre et al., 2016).

**Tabla 13**

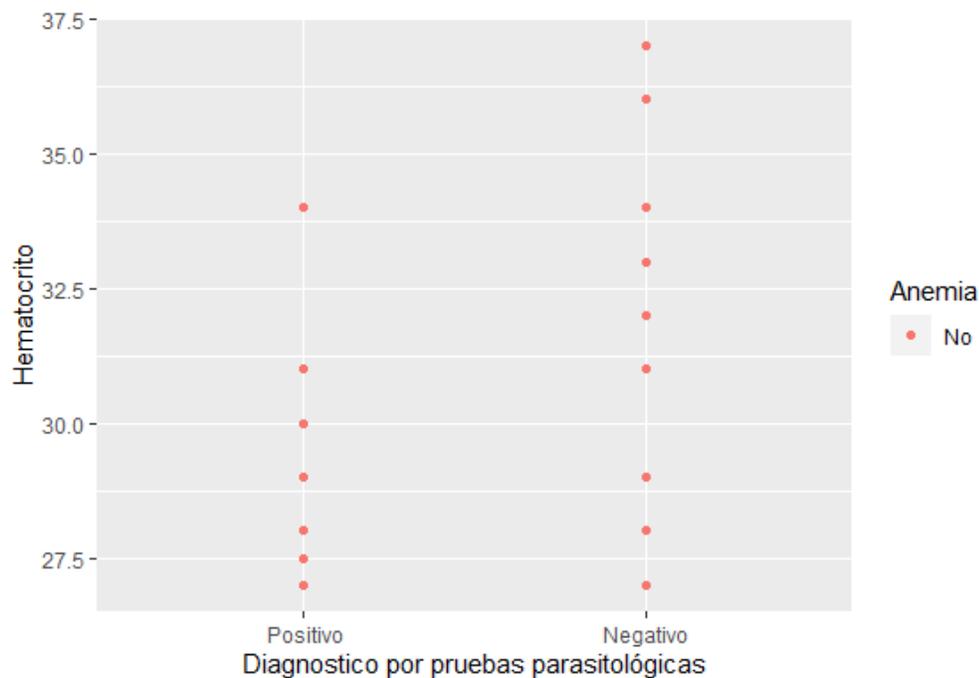
Pruebas parasitológicas con hematocrito, provincia de Napo 2021.

COD.LAB.	Hematocrito (%)	Woo	Frotis
2021-211	30	+++	
2021-212	27.5	-	<i>Trypanosoma Vivax</i> ++
2021-214	28	+++++	linfocitosis, <i>T. vivax</i> +
2021-215	29	+	Eosinofilia, <i>T. vivax</i> ++++
2021-216	28	-	Anaplasma 1/10 000
2021-220	29	-	Anaplasma 1/10 000
2021-225	27	+	<i>Trypanosoma Vivax</i> ++++
2021-230	27	-	
2021-231	27	++	<i>Trypanosoma vivax</i> +
2021-233	27	-	
2021-236	29	+++	<i>Trypanosoma vivax</i> +++
2021-238	28	-	
2021-239	28	+	<i>Trypanosoma vivax</i> +

*Nota:* (+) muestras positivas en la prueba de Woo y frotis, la cantidad de + es una cuantificación de la cantidad de parasitemia en la muestra de sangre.

**Figura 10**

Relación entre el Hematocrito y el diagnostico obtenido por las pruebas rápidas, provincia Napo



#### 4.3. Temperatura

La temperatura es un factor asociado a la respuesta del sistema inmunológico frente a la invasión de un agente desconocido en el huésped, permitiendo ser un indicador de la presencia de un patógeno, por lo tanto, en las muestras obtenidas de la provincia de Napo con evidencia de *T. vivax* se analizó la dependencia entre la temperatura y los resultados obtenidos de las pruebas parasitológicas, mediante la prueba de Fisher ( $p > 0.05$ ), Chi-cuadrado ( $p > 0.05$ ) y error tipo II ( $p < 0.05$ ) como prueba de hipótesis, tomando en cuenta la temperatura de 39.5 °C para determinar fiebre (tabla 14).

Este análisis permitió determinar que la fiebre es dependiente de los resultados de las pruebas parasitológicas (woo y frotis sanguíneo) para diagnóstico de *T. vivax*, debido a que las pruebas parasitológicas cuentan con una alta sensibilidad cuando esta se encuentra en la fase

aguda de la infección por *T. vivax*, dicha fase se caracteriza por las fluctuaciones de la parasitemia, que conlleva a una fiebre de tipo recurrente, posteriormente, a medida que la parasitemia se reduce, la temperatura se normaliza hasta alcanzar una temperatura normal (Gonzatti et al., 2014).

Por lo tanto, la temperatura de los bovinos con diagnóstico positivo en pruebas parasitológicas se encuentran en un rango de 39.3 °C a 40.4 °C, relacionando las pruebas parasitológicas con la fiebre, se determinó que los animales cumplen con las características a una fase inicial de la infección por *T. vivax* (Figura 11), sin embargo, es necesario aumentar el tamaño de muestra para evitar errores estadísticos.

Cabe resaltar que los bovinos muestreados en Napo previamente fueron tratados con una droga para *Trypanosoma spp.*, sin embargo, al no tener un correcto tratamiento se pudo observar un rebrote de la enfermedad y por esta razón se logró encontrar animales que cumplen con las características a una fase inicial de la infección por *T. vivax* (Desquesnes, 2004; Gonzatti et al., 2014).

En relación con los resultados de frotis sanguíneos se encontró eosinofilia, anaplasma 1/10 000 y *T. vivax* (tabla 15), las cuales se relacionan con la temperatura alta en los bovinos de la provincia de Napo. En los bovinos muestreados de Esmeraldas y Manabí, los animales que presentaron fiebre alta concordaban con infecciones por *Anaplasma spp.* determinadas mediante frotis sanguíneo.

Tabla 14

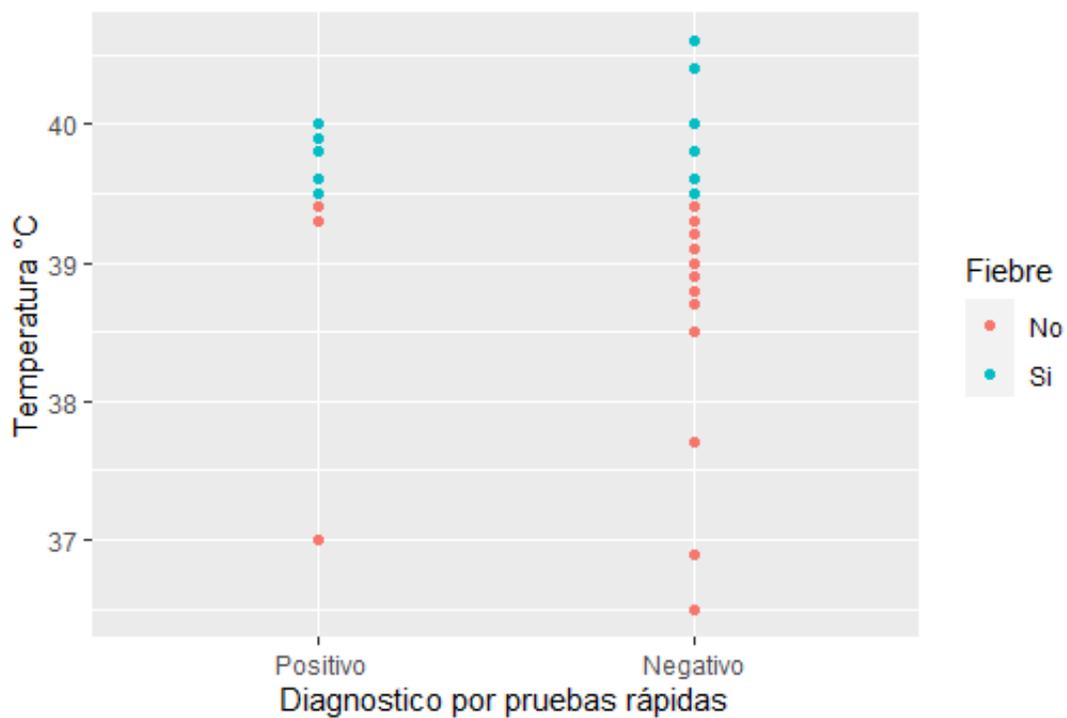
*Prueba de independencia entre la temperatura y pruebas directas (woo y frotis sanguíneo).*

	Pruebas directas Positivas	Pruebas directas Negativas	Total
Temperatura normal	4 (10 %)	22 (55 %)	26 (65 %)
Temperatura alta (Fiebre)	5 (12.5 %)	9 (22.5 %)	14 (35 %)
<b>Total</b>	<b>9 (22.5 %)</b>	<b>31 (77.5 %)</b>	<b>40</b>

*Nota:* Prueba de Fisher p- value 0.2338; Chi-cuadrado ( $p > 0.05$ ): Error tipo II ( $p < 0.05$ )

Figura 11

*Relación de la temperatura y el diagnostico obtenido por las pruebas rápidas.*



**Tabla 15**

*Pruebas rápidas con temperatura superior a partir de 39.5 °C, provincia de Napo 2021.*

<b>COD. LAB.</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Woo</b>	<b>Frotis</b>
<b>2021-212</b>	39.5	Negativo	<i>Trypanosoma Vivax</i> ++
<b>2021-213</b>	39.6	Negativo	Eosinofilia
<b>2021-215</b>	40	Positivo	Eosinofilia, <i>T. vivax</i> ++++
<b>2021-218</b>	39.8	Negativo	Anaplasma 1/10 000
<b>2021-220</b>	40.4	Negativo	Anaplasma 1/10 000
<b>2021-222</b>	39.8	Positivo	Eosinofilia, <i>T. vivax</i> ++++
<b>2021-223</b>	40.6	Negativo	-
<b>2021-225</b>	39.6	Positivo	<i>Trypanosoma Vivax</i> ++++
<b>2021-239</b>	39.9	Positivo	<i>Trypanosoma vivax</i> +
<b>2021-241</b>	40	Negativo	-
<b>2021-245</b>	39.5	Negativo	Eosinofilia
<b>2021-250</b>	39.8	Negativo	Eosinofilia
<b>2021-253</b>	39.6	Negativo	Anaplasma 1/1 000

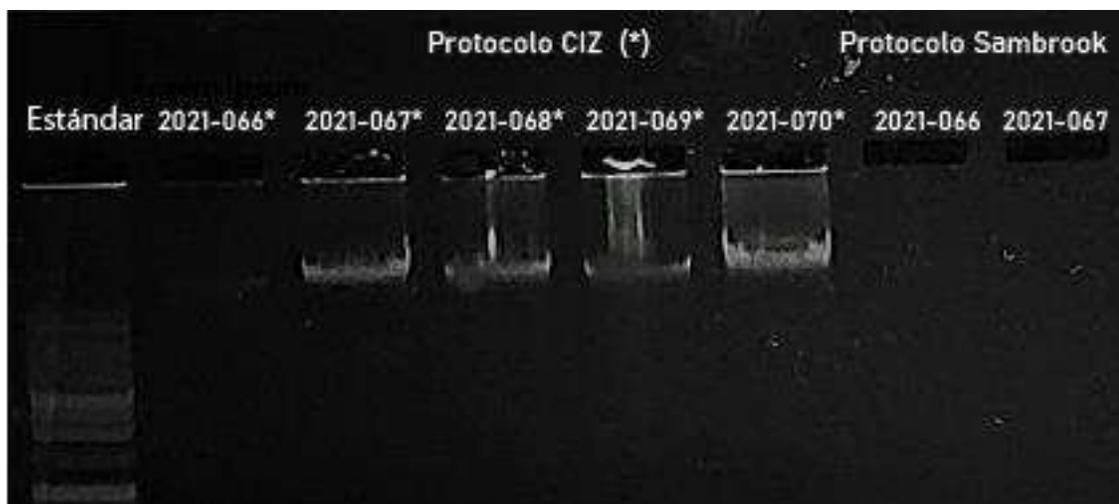
#### **4.4. Estandarización de protocolos para la extracción de ADN**

Las muestras de sangre fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE sede Santo Domingo.

Utilizando el protocolo del Instituto de investigación en Zoonosis-CIZ modificado de Riera et al. (2010), para el procesamiento de la extracción del ADN, se obtuvo bandas definidas mediante electroforesis, las cuales determinan una integridad alta del ADN extraído y purificado (BancoADN, 2020). Mientras que con el método descrito por Sambrook se presentó en algunas muestras la ausencia de banda, evidenciando que no se extrajo el ADN (Figura 13). Es por esto que, en el presente trabajo, se trabajó como método de extracción de ADN, con la metodología descrita por Riere et al., (2010)

**Figura 12**

*Amplificación de los protocolos en la extracción de ADN de las muestras procesadas, 2021*



*Nota:* Electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % de las extracciones de ADN con distintos protocolos, se representa: Marcador 1 Kb: DNA Ladder Promega; 2021-066\* al 221-070\*, Protocolo CIZ y del 2021-066 al 2021-067, protocolo Sambrook.

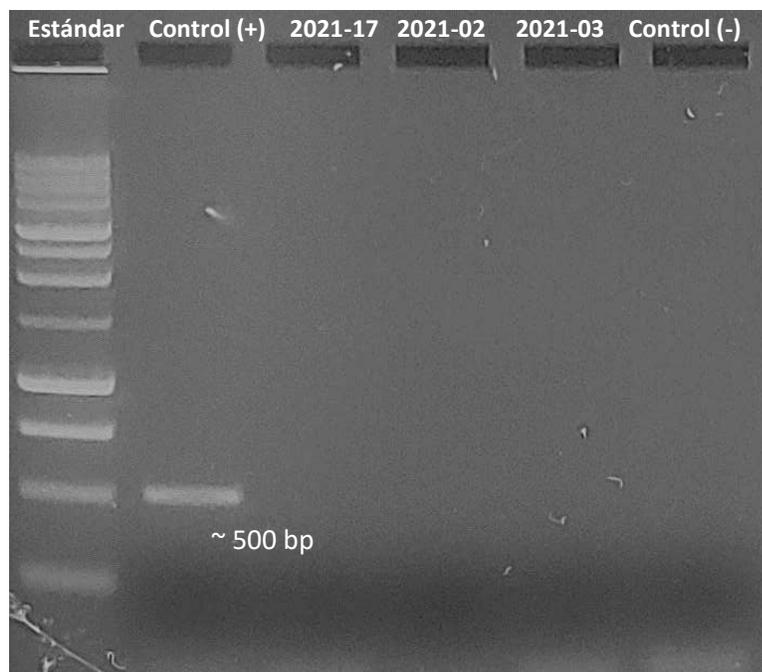
#### **4.5. Amplificación de fragmentos de *Trypanosoma spp***

En las muestras procesadas de la provincia de Santo Domingo y Esmeraldas, no se encontró amplificación comparando con el control positivo de un plásmido del laboratorio, que contiene la secuencia de CatL de *T. vivax*, por lo cual asumimos no existe la presencia de *T. evansi* y *T. vivax* (Figura 14) en nuestros muestreos.

En las muestras de Napo, 4 muestras resultaron ser positivas del total de 5 animales muestreados con los primer genéricos para *Trypanosoma spp* (Figura 15), estos resultados se encuentran representados en la Tabla 16.

**Figura 13**

*Amplificación de fragmentos de Trypanosoma spp*



*Nota:* Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % de productos de PCR de CatL para *Trypanosoma spp.*, se representa: Marcador 1 Kb: DNA Ladder Promega; plásmido con la región CatL (control positivo). 2021-001 al 221-003: Control negativo.

**Tabla 16**

*Resultados de la amplificación de fragmentos de Trypanosoma spp.*

Provincias	Animales muestreados	PCR	
		(n)	%
Santo Domingo	135	0	-
Esmeraldas	26	0	-
Napo	5	4	80
<b>Total</b>	<b>166</b>	<b>4</b>	<b>80</b>

*Nota:* Las muestras procesadas de Napo solo se realizaron las 5 primeras muestras.

**Figura 14**

*Amplificación de fragmentos de Trypanosoma spp de la provincia de Napo*



*Nota:* Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de productos de PCR de CatL genérico de *Trypanosoma spp*. Se representa: control positivo estándar (plásmido); control positivo PCR (plásmido); 2021-211 tenue positivo, 2021-212 tenue positivo, 2021-213 negativo, 2021-214 positivo y 2021-215 positivo; control negativo.

#### **4.6. Estandarización de la PCR para *T. vivax***

Los reactivos del PCR para *T. vivax* se modificaron varias condiciones y se determinó que la banda mejor definida y analizando el uso de reactivos son con las condiciones de 1.5 Mm de  $MgSO_4$ , 1.25 U/ $\mu L$  de Taq polimerasa y 1.0  $\mu M$  de primers en concentraciones finales (Tabla 17) presente en el pocillo 2 (Figura 15), por lo cual se continuo con dichas concentraciones para realizar la amplificación de CatL de *T. vivax*.

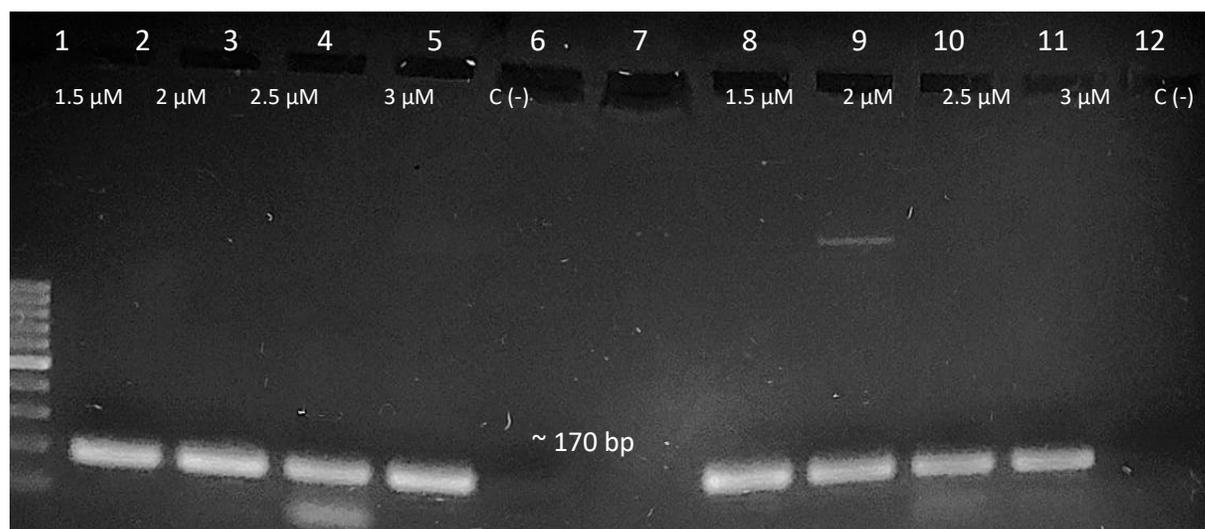
Tabla 17

Componentes de la PCR para amplificación de *CatL* de *Trypanosoma vivax*

Reactivos	Concentración Final	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O		-
Buffer	1.00	2.50
TviCatL	1.00 $\mu\text{M}$	2.50
DT0155	1.00 $\mu\text{M}$	2.50
MgSO <sub>4</sub>	1.50 Mm	0.00
DNTPs	0.80 Mm	0.50
Taq	1.25 U/ $\mu\text{L}$	0.25
ADN	100 ng	2
<b>Volumen Total</b>		<b>25.00</b>

Figura 15

Estandarización de la PCR para fragmento específico de *T. vivax*



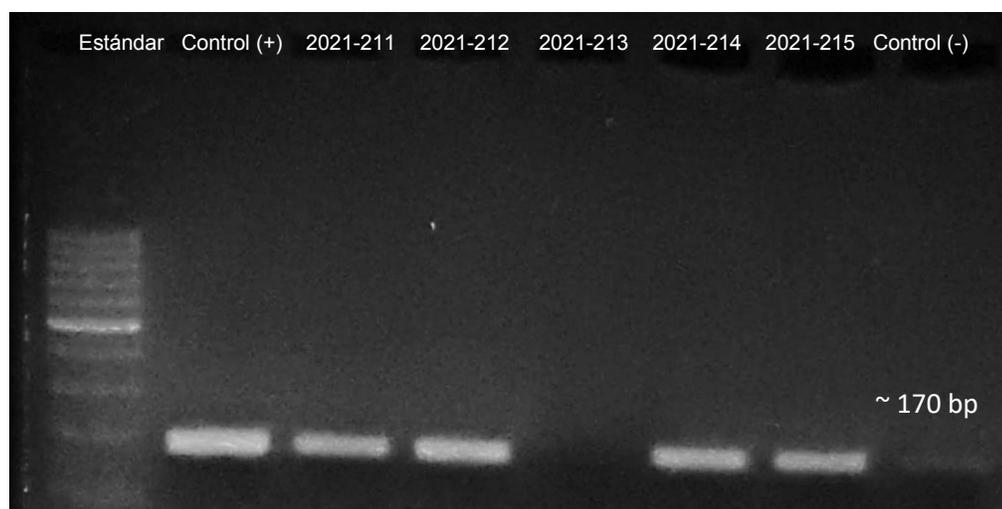
*Nota:* Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de *TviCatL-PCR* para *T. vivax*. Se representa: Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; desde el pocillo 1 se realizó un gradiente de MgSO<sub>4</sub> en concentraciones de 1.5  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  y el control negativo – C (-), la primera PCR y desde el pocillo 8 con el gradiente de MgSO<sub>4</sub> y el control negativo – C (-), la segunda PCR.

#### 4.3. Amplificación de fragmentos de CatL de *Trypanosoma vivax*

La TviCatL-PCR para el fragmento específico de *T. vivax* se realizó en todas las muestras obtenidas de la provincia de Napo, obteniendo un fragmento aproximadamente de 170 pb, donde se obtuvo un 36.96% de muestras positivas (17/46), siendo una prueba con gran especificidad y sensibilidad para el diagnóstico (Figura 17), el uso de un plásmido realizado en el laboratorio que contiene el gen catL de *T. vivax* permitió comparar las bandas obtenidas en el PCR convencional de 170pb. La identificación de *T. vivax* mediante TviCatL-PCR es altamente específica y sensible para el diagnóstico del hemoflagelado, aun a pesar de la gran diversidad genética que presenta el *T. vivax* en África y América (Cortez et al., 2009). Esta técnica ha sido empleada para determinar la prevalencia en países como Venezuela en el que se determinó infecciones constantes por *T. vivax* con bajos niveles de parasitemia, permitiendo el diagnóstico por métodos moleculares del 23% de los búfalos examinados (García et al., 2016), en Brasil, se utilizó esta prueba en el diagnóstico de búfalos y bovinos, presentando una prevalencia de 28.1% y 24.6%, respectivamente (García Pérez et al., 2020).

#### Figura 16

*Amplificación de fragmentos de Trypanosoma vivax por TviCatL-PCR*



*Nota:* Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de *TviCatL-PCR* para *T. vivax*. Se representa: Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; 2021-211 al 215 y control (-): plásmido (control positivo).

#### 4.4. Prevalencia de *T. vivax* por muestreo

La prevalencia en las provincias muestreadas, en las pruebas parasitológicas se encontró una prevalencia en la provincia de Napo en prueba de woo 19,57% (9/46), en frotis 17,39% (8/46) y mediante prueba molecular PCR un 36.96% (17/46), mientras que en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas y Manabí no se encontró muestras positivas a *T. vivax* (Tabla 18).

**Tabla 18**

*Distribución de Trypanosoma vivax en bovinos de 4 provincias del Ecuador en 2021.*

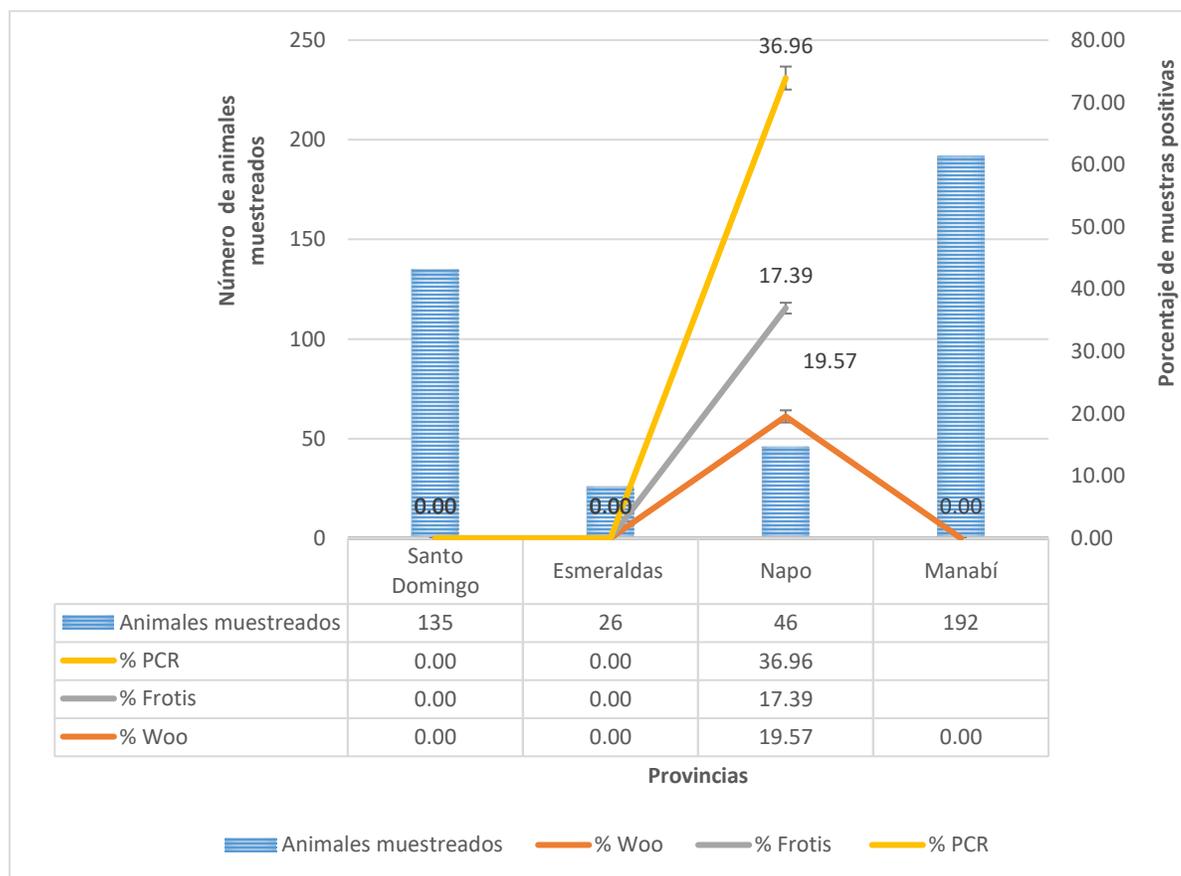
Provincias	Animales muestreados	Woo		Frotis		PCR	
		(n)	%	(n)	%	(n)	%
<b>Santo Domingo</b>	135	0	-	0	-	0	-
<b>Esmeraldas</b>	26	0	-	0	-	0	-
<b>Napo</b>	46	9	19,57	8	17,39	17	36,96
<b>Manabí</b>	192	0	-	0	-		
<b>Total</b>	399	9	19,57	8	17,39	17	36.96

La prevalencia de tripanosomosis en los hospedadores varía dependiendo del método de detección, en las cuales las estimaciones más altas son determinadas por método serológico debido a la persistencia de anticuerpos tras la infección, en comparación con las pruebas parasitológicas, las cuales solo permiten diagnosticar la enfermedad en las fases agudas, por lo tanto, altos niveles de parasitemia en la sangre con la técnica de centrifugación con microhematocrito, incrementa la sensibilidad de las pruebas de PCR (Fetene et al., 2021). En nuestro caso, estadísticamente existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) al comparar las pruebas

parasitológicas directas y las pruebas moleculares para el diagnóstico de *T. vivax* (Figura 17), por lo tanto al comparar los métodos moleculares con los métodos directos o parasitológicos, se puede encontrar una gran diferencia debido a que los métodos directos generalmente permite identificar la enfermedad dependiendo de las fluctuaciones de la parasitemia, dificultando el diagnóstico en niveles de parasitemia bajos, sin embargo, la técnica de centrifugación del hematocrito es una de las mejores técnicas para obtener una sensibilidad alta durante el período de la infección, mientras que los métodos moleculares cuenta con mayor sensibilidad, permitiendo el diagnóstico tanto en la fase aguda como en fase crónica de la infección (Fidelis Junior et al., 2016).

**Figura 17**

*Distribución de Trypanosoma vivax en bovinos de 4 provincias del Ecuador en 2021*



Respecto las muestras positivas se determinó la capacidad de diagnóstico de cada prueba, la técnica woo identifico el 52.94% (9/17) y la técnica por frotis sanguíneo el 47.06% (8/17) de las muestras positivas conocidas mediante diagnóstico PCR, además, al comparar entre las pruebas de diagnóstico, el 41.17% (7/17) de muestras positivas fue diagnosticada mediante las 3 técnicas empleadas en el estudio, sugiriendo que dicha población se encontraba en etapa aguda de la enfermedad. Las pruebas parasitológicas son las más empleadas para el diagnóstico permitiendo identificar casos con niveles altos de parasitemia asociado con el estado agudo de la enfermedad, las fluctuaciones de la parasitemia impiden que estas pruebas logren determinar todos los casos de infección por *Trypanosoma spp.* (Fidelis Junior et al., 2019).

El diagnóstico identificado solo por la técnica el PCR es del 47.06% (8/17), dicha técnica tiene una alta sensibilidad especialmente en las fases patentes y subpatente de la enfermedad, sugiere que esta población en estado subpatente de la enfermedad (Fidelis Junior et al., 2019).

Los diagnóstico molecular cuenta con mayor capacidad de identificación comparado con las técnicas parasitológicas en la que el diagnóstico por frotis fue el más bajo entre las técnicas utilizadas, debido a que se puede presentar errores en la fijación y/o tinción de la muestra, sin embargo, el uso de emplear varias técnicas de diagnóstico permite que se puede conocer la parasitemia en la población, evitar falsos negativos y llevar a cabo un correcto control de la enfermedad.

Las muestras identificadas como positivas se asociaron con el porcentaje de hematocrito, en las pruebas parasitológicas se obtuvo una media de 29.05% de hematocrito, mientras que con prueba molecular PCR, la media de 30.25% de hematocrito, no se encontró diferencia significativa estadísticamente, sin embargo, el hematocrito al inicio de la enfermedad

dependiendo del tiempo de infección del *T. vivax* en el estudio por Parra-Gimenez & Reynabello, (2019) se evidencio que el hematocrito desciende desde la infección, pero en el periodo de 9 a 14 días de infección el hematocrito se encuentra en un rango de 20 a 35% de hematocrito, esto sugiere que la infección se encontraba en dicho periodo, acotando que se suministró una droga previamente al muestreo generando un rebrote (Figura 18; Tabla 19).

La temperatura de los animales identificados positivos a *T. vivax* por diagnostico parasitológico tiene una media de 39.32°C concordando con los análisis realizados previamente presentando relación con el nivel de parasitemia y con el estudio por Parra-Gimenez & Reynabello, (2019) donde se evidencio que la temperatura en el periodo de 9 a 14 días de infección cuenta con un pico hasta alcanzar los 41°C, mientras que la media de los positivos con diagnóstico molecular PCR es de 39.42 °C, de manera que concuerda con el rango para determinación de fiebre, sin embargo, no se encontró diferencia significativa estadísticamente, debido a ciertos animales negativos a *T. vivax* que presentaron fiebre, esto sugiere que el nivel de parasitemia se encontraba demasiado bajo para ser detectado por PCR o que estos contaban con alguna enfermedad (Figura 18; Tabla 19) (Fidelis Junior et al., 2019).

#### **4.5. Amplificación de fragmentos de ITS**

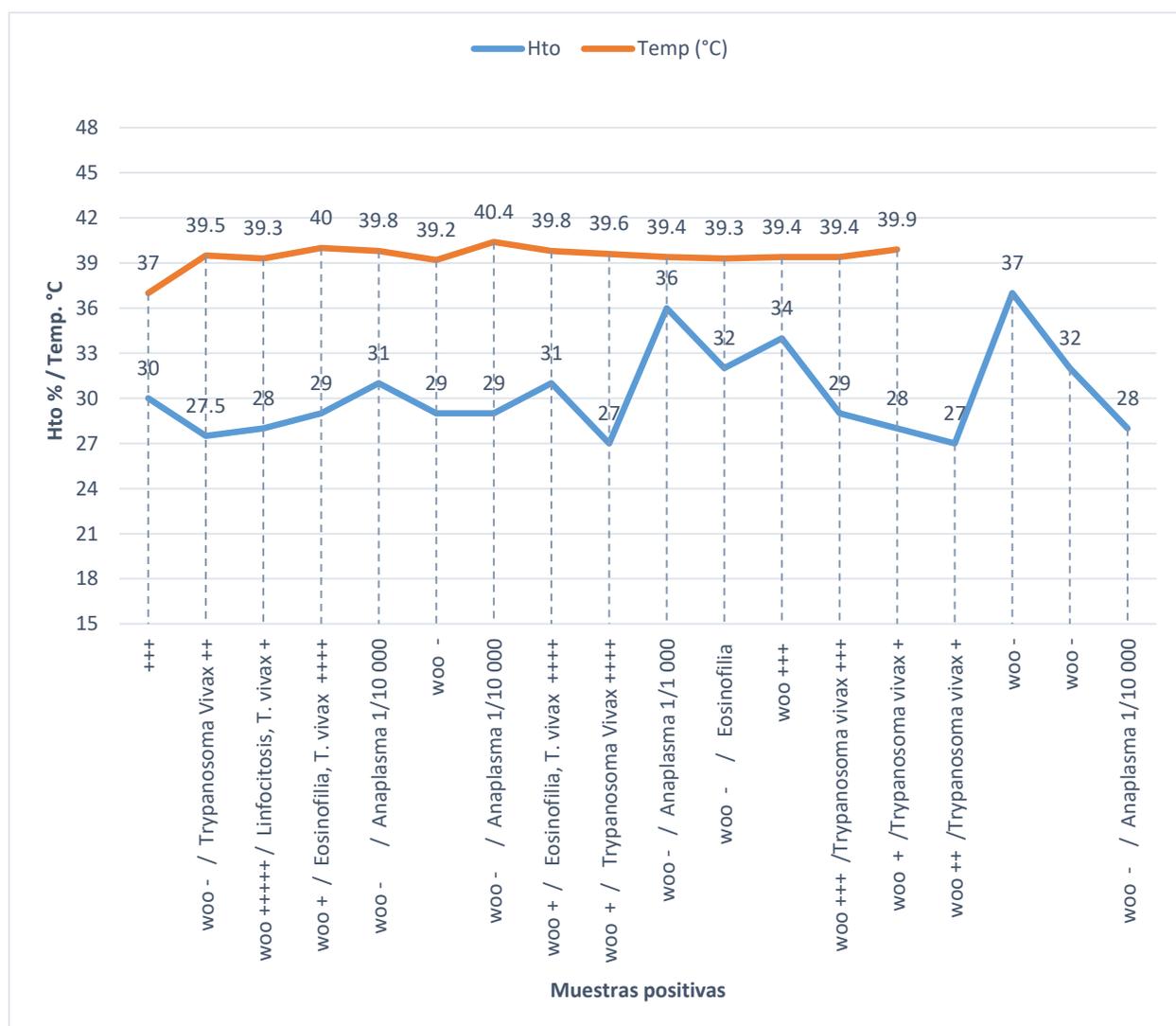
La amplificación de los ITS de *Trypanosoma spp.*, generó un fragmento de ~620 bp el cual coincide con lo descrito para *T. vivax* (Cox et al., 2005). En esta prueba, se utilizó como control positivo en un plásmido de *T. theileri* de ~998 bp (gentilmente cedido por la Ingeniera Cholota) que se puede evidenciar en la Figura 19.

Anteriormente, la amplificación de ITS se realizaba como prueba de diagnóstico, sin embargo, utilizar estos marcadores cuentan con limitaciones para el diagnóstico de *T. vivax*, en los que se ha reflejado la incapacidad de detectar ciertas poblaciones africanas de *T. vivax*, a

pesar de ello estos marcadores moleculares permiten realizar caracterización molecular, al discernir entre de varias especies de *Trypanosomas spp.*, a través de la secuenciación del fragmento obtenido por ITS-PCR, por lo cual para el diagnóstico molecular de *T. vivax* en una población facilitando el diagnóstico es mediante la TviCatL-PCR y a su vez, la técnica con PCR convencional permite obtener un diagnóstico con mayor sensibilidad y especificidad (Cortez et al., 2009).

**Figura 18**

**Contraste de muestras positivas con hematocrito y temperatura.**



**Tabla 19***Contraste de muestras positivas a T. vivax con datos de Hematocrito y Temperatura*

COD.LAB.	Hto	Temp (°C)	Woo	Frotis	PCR/Género	PCR/TviCatL	PCR/ITS
2021-211	30	37	+++	*	+	+	+
2021-212	27.5	39.5	-	Trypanosoma Vivax ++	+	+	
2021-214	28	39.3	+++++	linfocitosis, T. vivax +	+	+	+
2021-215	29	40	+	Eosinofilia, T. vivax +++++	+	+	
2021-218	31	39.8	-	Anaplasma 1/10 000		+	
2021-219	29	39.2	-			+	
2021-220	29	40.4	-	Anaplasma 1/10 000		+	
2021-222	31	39.8	+	Eosinofilia, T. vivax +++++		+	
2021-225	27	39.6	+	Trypanosoma Vivax +++++		+	
2021-226	36	39.4	-	Anaplasma 1/1 000		+	
2021-227	32	39.3	-	Eosinofilia		+	
2021-228	34	39.4	+++			+	
2021-236	29	39.4	+++	Trypanosoma vivax +++		+	
2021-239	28	39.9	+	Trypanosoma vivax +		+	
2021-231	27		++	Trypanosoma vivax +		+	
2021-232	37		-			+	
2021-235	32		-	*		+	
2021-216	28		-	Anaplasma 1/10 000		+	

*Nota:* \* en muestras con frotis sanguíneo, se presentó problemas en la fijación y tinción.

**Figura 19***Amplificación de fragmentos ITS de Trypanosoma vivax*

*Nota:* Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de PCR ITS de *T. vivax*. Se representa: Marcador 100bp: DNA Ladder Promega; 2021-017, 2021-211 y 2021-214: plásmido con la región ITS *T. theileri* (control positivo).

#### 4.6. Análisis de similitud y homología de las secuencias amplificadas por ITS

Se determinó a partir de las secuencias obtenida de los ITS de los aislados en Napo la similitud y homología con secuencias del GenBank, mediante la herramienta de BLAST, las secuencias obtenidas cuentan con 940 pb y 990 pb, de las muestras M301 y M302, respectivamente, confirmando que los dos aislados son similares a secuencias de *Trypanosoma vivax*, en un 98.41% y 98.38% (Tabla 20).

Los resultados encontrados en este estudio demostraron homología con *T. vivax*, esta especie fue ya descrita y caracterizada molecularmente por primera vez en Ecuador en Chone por Chávez-larrea et al., (2020), sin embargo, este proyecto documenta un brote de *T. vivax* en la provincia de Napo, perteneciente a la región amazónica del Ecuador. Se puede determinar

que los brotes de tripanosomosis se han distribuido debido a la introducción de ganado enfermo en fincas sin hemotrópicos o compra de ganado, sin tener en cuenta las medidas de bioseguridad para el control de enfermedad hemotrópicas,

**Tabla 20**

*Secuencias similares y homologas de la base de datos GenBank de las muestras M301 y M302 obtenidas por nested PCR de ITS.*

<b>Aislado de Napo - Ecuador</b>	<b>Tamaño del fragmento alineado</b>	<b>Secuencia similar de GenBank</b>	<b>Número de acceso GenBank</b>	<b>Porcentaje de Identidad</b>	<b>E – value</b>
M301	561 bp	Trypanosoma vivax 18S, 5.8S, 28S-LS1, and srRNA1 ribosomal RNA, complete sequence	U22316.1	98.41%	0.0
M302	549 bp	Trypanosoma vivax Y486 annotated genomic contig, chromosome 3	HE573019.1	98.38%	0.0

Por otra parte, es importante señalar que la ausencia de estudios de prevalencia y control de esta enfermedad y los vectores que aumentan el potencial del parásito para la infección, contribuyen a la distribución de la tripanosomosis en Latinoamérica, es por ello, que la tripanosomosis bovina representa una gran amenaza para las industrias ganaderas de todo el Ecuador, al comparar esto, por ejemplo con las pérdidas económicas en países latinoamericanos donde se aproximan a los \$160 millones de dólares (Fetene et al., 2021).

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

En este estudio se evidenció un brote de tripanosomosis bovina debido a *T. vivax* en la provincia de Napo, en la cual se llevó a cabo la identificación del parásito mediante pruebas parasitológicas (woo y frotis sanguíneo) y pruebas moleculares (TviCatL-PCR). Estos resultados fueron confirmados mediante la secuenciación de los ITS, obteniendo una identidad de 98.41% y 98.38% de homogeneidad con *Trypanosoma vivax*. Este estudio permitió por primera vez caracterizar molecularmente con la ayuda de los ITS un aislado de *T. vivax* del Ecuador.

En las zonas de producción pecuaria analizadas se demostró la presencia de hemotrópicos, en todas las provincias se encontró anaplasma por frotis sanguíneo, además de un brote de *T. vivax* en la provincia de Napo en la que se determinó una prevalencia de 36.96% (17/46) por pruebas moleculares y por pruebas parasitológicas de 19.57% (9/46) por woo y 17,39% (8/46) por frotis.

En la evaluación estadística de la influencia de los hemotrópicos con altos niveles de parasitemia sobre la temperatura, se demostró diferencias significativas sugiriendo la influencia de la parasitemia en los signos clínicos de la población de Napo, además de sugerir estado agudo de la enfermedad, mientras que, sobre el hematocrito, no se encontró diferencia significativa, lo que se puede explicar por los tratamientos empleando previos al muestreo o ciertos casos crónicos de la enfermedad.

Los resultados de la secuenciación e ITS-PCR permitieron realizar la identificación de *Trypanosoma vivax*, por lo que el uso de estos marcadores, evidenciaron la especie de tripanosoma en las muestras analizadas.

## CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Se recomienda utilizar la PCR/TviCatL para el diagnóstico de *T. vivax*, debido a la facilidad de la técnica en comparación con PCR/ITS, además realizar estudios filogenéticos con el fin de determinar la relación genética con otros reportes de *T. vivax*, reportados en Ecuador.

Se recomienda el uso de pruebas parasitológicas cuando se presentan signos clínicos, representativos de *Trypanosoma vivax*, lo cual permite llevar un manejo rápido de la enfermedad para evitar el deterioro del animal y su consecuente muerte, así como la propagación por vectores hemofagos.

Se recomienda dar a conocer los brotes de tripanosoma a organismos como agrocalidad para el debido control, con el fin de evitar la distribución de *Trypanosoma vivax* y pérdidas económicas por muerte del ganado.

Se recomienda realizar un seguimiento a las provincias con reportes de hemotrópicos, para una adecuada prevención y control zoo sanitario, además, de organizar conferencias informativas y capacitaciones a los ganaderos, personal de manejo y organismos encargados de prevención y control zoo sanitario.

## CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Agrocalidad. (2018). "Toma Y Envío De Muestras En Animales Domésticos." Instructivo IINT/DA/019, 27. <http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2018/02/11-INT-DA-19-Rev-4.pdf>
- Bancoadn. (2020). Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). *Banco ADN*, 1–10. Retrieved from [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)
- Boada-sucre, A. A., Rossi Spadafora, M. S., Tavares-marques, L. M., Finol, H. J., & Reyna-bello, A. (2016). Trypanosoma vivax Adhesion to Red Blood Cells in Experimentally Infected Sheep, 2016.
- Carlyon, J. A., & Fikrig, E. (2003). Invasion and survival strategies of Anaplasma phagocytophilum. *Cellular Microbiology*, 5(11), 743–754. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00323.x>
- Center for Food Security & Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics, I. S. U.-C. of V. M. (2018). African Animal Trypanosomiasis African Animal Trypanosomiasis. *In Vitro*, 1–5.
- Chávez-larrea, A. M., Medina-pozo, M. L., Cholota-iza, C. E., & Reyna-Bello, A. (2020). First report and molecular identification of Trypanosoma (Duttonella) vivax outbreak in cattle population from Ecuador. <https://doi.org/10.1111/tbed.13906>
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., ... Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of Trypanosoma vivax from Africa and South America – characterization , relationships and diagnostic implications q. *Molecular and Cellular*

*Probes*, 23(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>

Cox, A., Tilley, A., Mcodimba, F., Fyfe, J., Eisler, M., Hide, G. V, & Welburn, S. (2005). A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood, *111*, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.014>

Desquesnes, M, La Rocque, S. D. La, & Peregrine, A. S. (1995). French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride, *60*, 133–136.

Desquesnes, Marc. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America*.

Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 14(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x>

Fidelis Junior, O. L., Sampaio, P. H., Gonçalves, L. R., André, M. R., Zacarias Machado, R., Wijffels, G., & Cadioli, F. A. (2019). Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle, *2961*(june), 203–209.

Fidelis Junior, O. L., Sampaio, P. H., Machado, R. Z., André, M. R., Marques, L. C., & Cadioli, F. A. (2016). Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology : Orgao Oficial Do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 25(1), 69–81. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016013>

Garcia, H. A., Ramírez, O. J., Rodrigues, C. M. F., Sánchez, R. G., Bethencourt, A. M., Del M Pérez, G., ... Teixeira, M. M. G. (2016). *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan

Llanos: An unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. *Veterinary Parasitology*, 230, 49–55.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.013>

García Pérez, H. A., Rodrigues, C. M. F., Pivat, I. H. V., Fuzato, A. C. R., Camargo, E. P., Minervino, A. H. H., & Teixeira, M. M. G. (2020). High *Trypanosoma vivax* infection rates in water buffalo and cattle in the Brazilian Lower Amazon. *Parasitology International*, 79, 102162.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102162>

Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., M. Aso, P., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5>

Greif, G., Rodriguez, M., Reyna-Bello, A., Robello, C., & Alvarez-Valin, F. (2015). Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 773, 69–82.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.008>

Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2017). Spatial-Temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp . in cattle ( *Bos taurus* ) and ... dynamics of these parasites in Colombia, (December).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004>

Magez, S., Pinto Torres, E. J., 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.

Medina Naranjo, V. L., Reyna Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron Román, J. W., Moyano, J. C., ... Chávez Larrea, M. A. (2017). DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS

Anaplasma marginale, Trypanosoma spp. Y Babesia spp. MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE ELISA Y PCR EN TRES FINCAS GANADERAS DE LA PROVINCIA DE PASTAZA, ECUADOR, XXVII(3).

Mejía Tobón, J. S. (1995). Análisis de la estructura primaria de la trans-sialidada de Trypanosoma cruzi, Identificación del sitio de reconocimiento de los residuos de ácido sialico y del sitio catalítico de la enzima. Retrieved from <https://revistas.ces.edu.co/index.php/medicina/article/view/1363/1508>

OIE Terrestrial Manual. (2008), 813–822.

Otte, M. J., Abuabara, J. Y., & Wells, E. A. (1994). Trypanosoma vivax in Colombia: Epidemiology and production losses. *Tropical Animal Health and Production*, 26(3), 146–156. <https://doi.org/10.1007/BF02241071>

Parra-Gimenez, N., & Reyna-bello, A. (2019). Response of Experimentally Infected Sheep with Venezuelan Isolates of Trypanosoma evansi , Trypanosoma equiperdum , and Trypanosoma vivax, 2019.

Pereira, S. S., Almeida, K. J. G. De, Neto, C., Duffy, C. W., Richards, P., Noyes, H., ... Jackson, A. P. (2020). Variant antigen diversity in Trypanosoma vivax is not driven by recombination, (559), 1–13.

Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., & Hinchcliff, K. W. (2002). Medicina veterinaria. Retrieved from <http://meran.fcv.unlp.edu.ar/meran/opac-detail.pl?id1=809>

Ramirez-Barrios, R., Reyna-Bello, A., Parra, O., Valeris, R., Tavares-Marques, L., Brizard, J.-P., ... Holzmüller, P. (2019). Trypanosoma vivax infection in sheep: Different patterns of virulence and pathogenicity associated with differentially expressed proteomes.

*Veterinary Parasitology*: X, 2, 100014. <https://doi.org/10.1016/j.vpoa.2019.100014>

Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para peque ? os volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (14), 4–7.

Sambrook, r J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volumen 2.

Retrieved from

<https://books.google.com.ec/books?id=YTxKwWUiBeUC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>

Wells, E. A., Betancourt, A., & Ramirez, L. E. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. England. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90055-4)