



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Evaluación del uso de un medicamento para el tratamiento y el control de la
tripanosomiasis bovina.**

Viscarra Sánchez, Lissette Melissa

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Reyna Bello, Armando Ph.D.

27 de febrero del 2023

Reporte de verificación de contenido



CERTIFICADO DE ANÁLISIS
magister

TESIS LISSETTE VISCARRA

Nombre del documento: TESIS LISSETTE VISCARRA sin
formatos.docx
ID del
documento: 89abb401448084f6173af83ef6d56c9e6c56ab3
Tamaño del documento original: 3,87 Mo

Depositante: MILTON VINICIO UDAY PATIÑO
Fecha de depósito: 27/2/2023
Tipo de carga: **interfaz**
fecha de **fin** de análisis: 27/2/2023

3% Similitudes
< 1% Texto entre comillas
< 1% similitudes entre comillas
2% Idioma no reconocido
Número de palabras: 11.156
Número de caracteres: 70.401

Ubicación de las similitudes en el documento:



Fuentes principales detectadas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	repositorio.espe.edu.ec https://repositorio.espe.edu.ec/jspui/bitstream/21000/32466/1/T-ESPE-052485.pdf 1 fuente similar	1%		Palabras idénticas: < 1% (138 palabras)
2	repositorio.espe.edu.ec Prevalencia del <i>Trombosoma theleri</i> en bovinos <i>graciarum</i> http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/25921/5/T-ESPE-003171.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (65 palabras)
3	repositorio.espe.edu.ec Prevalencia de <i>Trombosoma theleri</i> en bovinos <i>graciarum</i> http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/25913/5/T-ESPE-003160.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (49 palabras)
4	repositorio.espe.edu.ec Caracterización molecular y análisis filogenético de <i>Trombosoma theleri</i> http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/15337/5/T-ESPE-040551.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (42 palabras)
5	repositorio.espe.edu.ec Identificación y caracterización molecular de <i>Babesia canis</i> http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/28903/5/T-ESPE-003198.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (32 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	Documento de otro usuario #5413d3 El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (12 palabras)
2	repositorio.espe.edu.ec Identificación y caracterización molecular de <i>Anaplasma pl.</i> http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/28890/5/T-ESPE-003190.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (15 palabras)
3	hdl.handle.net Evaluación clínica, patológica y proteómica de dos aislados <i>varzola</i> http://hdl.handle.net/10396/13244	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (10 palabras)
4	dspace.espe.edu.ec Diseño de un sistema de gestión administrativa para la <i>Asoc.</i> http://dspace.espe.edu.ec/bitstream/123456789/14718/3/12T01392.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (11 palabras)
5	www.redalyc.org DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOTRÓPICOS <i>Anaplasma marginale</i>, Try. https://www.redalyc.org/journal/959/95952010005/html/	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (10 palabras)



Firmado electrónicamente por:
ARMANDO REYNA BELLO

Reyna Bello, Armando PhD

DIRECTOR



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Evaluación del uso de un medicamento para el tratamiento y el control de la tripanosomiasis bovina**” fue realizado por la señorita **Viscarra Sánchez Lissette Melissa** 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, 27 de febrero 2023

Firma:



Firmado electrónicamente por:
ARMANDO REYNA BELLO

Reyna Bello, Armando

C.C.:1758891830



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Viscarra Sánchez, Lissette Melissa**, con cédula de ciudadanía n° 0950206847, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Evaluación del uso de un medicamento para el tratamiento y el control de la tripanosomiasis bovina** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo, 27 de febrero del 2023

Firma:

Viscarra Sánchez, Lissette Melissa

C.C.: 0950206847



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo **Viscarra Sánchez, Lissette Melissa**, con cédula de ciudadanía n° 0950206847, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Evaluación del uso de un medicamento para el tratamiento y el control de la tripanosomiasis bovina** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo, 27 de febrero del 2023

Firma:

Viscarra Sánchez, Lissette Melissa

C.C.: 0950206847

Dedicatoria

A mis padres, Edwin y Ofelia, por su apoyo incondicional, especialmente a mi madre; mi motor
y luz que me impulsó a continuar en los días más oscuros.

A mis hermanas, Doménica y Eliana, por ser las mejores amigas que la vida me pudo conceder.

Lisette.

Agradecimientos

Agradezco profundamente a mis padres, Ofelia y Edwin, por su apoyo y amor incondicional, por ser mi fuente de inspiración diaria, por enseñarme que puedo conseguir todo que me proponga; a mis hermanas, Doménica y Eliana, por alegrarme en mis días tristes y ser siempre mi lugar seguro.

Agradezco infinitamente a Klever y Giovana, mis padres adoptivos, por abrirme las puertas de su hogar y de su corazón, por ser la familia funcional que no sabía que necesitaba.

De manera especial agradezco al Dr. Armando Reyna, por la apertura en el laboratorio, por su constante guía científica y académica, por los conocimientos impartidos desde la primeraclase, por compartir su pasión por la ciencia con nosotros e impregnarnos de la misma.

Al Ing. Fausto Bedoya por su ayuda, conocimiento y paciencia en el laboratorio y a lo largo del desarrollo de este trabajo.

Al proyecto “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico de una estrategia de control de la brucelosis y tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)” y al ARES de Bélgica por el financiamiento de este trabajo.

A la Ing. Cristina Cholota, por su colaboración en el trabajo de laboratorio. Al Ing. Sebastián Osorio y a Agrocalidad-Orellana, por el apoyo en las salidas de campo.

A mis amigas de siempre: Belén, Brenda, Cynthia y Emi, y a los amigos que la universidad me regaló: Margarita, Wendy, Joha, Katy, Nico, Ítalo, Jairo, Geno, Jorge, gracias por hacer esta etapa más amena y divertida, ha sido un verdadero placer coincidir en esta vida con ustedes.

A Kevin, por tu apoyo y cariño sincero, porque sin ti este trabajo no hubiera sido posible

Lisette.

Índice de contenido

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de Autoría	4
Autorización de Publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Índice de contenido	8
Listado de figuras	11
Listado de tablas	12
Lista de abreviatura	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del problema	16
Justificación.....	17
Objetivos del proyecto	18
<i>Objetivo general</i>	18
<i>Objetivo específico</i>	18

Hipótesis	18
Capítulo II: Marco teórico	19
Generalidades.....	19
Historia	19
<i>T. vivax</i>	20
Taxonomía	20
Morfología	21
Distribución	22
Transmisión y ciclo biológico	23
Signos clínicos	24
Inmunología	25
Métodos de diagnóstico	26
<i>Diagnóstico parasitológico (Método de Woo)</i>	26
<i>Diagnóstico molecular (PCR)</i>	27
Tratamiento	27
<i>Cloruro de Isometamidium</i>	28
Farmacología	30
Dosificación	30
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	31
Participantes	31
Zona de estudio	31
Duración de la investigación.....	31

	10
Fármaco utilizado.....	32
Fase de Campo	32
Obtención de muestras sanguíneas de ganado bovino.....	32
Prueba de Woo para el diagnóstico parasitológico.....	33
Extracción de ADN de sangre de muestras de ganado bovino	33
Verificación de ADN extraído en electroforesis horizontal.....	35
Estandarización de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) específico para <i>Trypanosoma vivax</i> mediante TWJ.	35
<i>Gradiente de temperatura de hibridación</i>	36
<i>Gradiente de cebadores</i>	38
Electroforesis horizontal en gel de agarosa.	39
Prevalencia	40
Análisis estadístico	40
Capítulo IV: Resultados.....	41
Extracción de ADN.....	41
Prueba de Woo y hematocrito	42
Estandarización de la prueba de PCR	44
Diagnóstico y prevalencia de <i>T. vivax</i>	45
Eficacia del tratamiento.....	47
Análisis estadístico	48
Capítulo V: Discusión	49
Capítulo VI: Conclusiones	56

Capítulo VII: Recomendaciones.....	57
Capítulo VIII: Bibliografía.....	58

Listado de figuras

Figura 1 <i>Estructura interna de T. vivax</i>	21
Figura 2 <i>Distribución geográfica de tripanosoma</i>	22
Figura 3 <i>Representación gráfica de fármacos para el tratamiento de tripanosomosis animal y mecanismos de acción.</i>	28
Figura 4 <i>Representación gráfica de la estructura química del cloruro de isometamidium</i>	29
Figura 5 <i>Extracción de ADN con GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (ThermoScientific)</i>	41
Figura 6 <i>Extracción de ADN a partir del protocolo casero</i>	42
Figura 7 <i>Gradientes de la estandarización de la TWJ-PCR</i>	45
Figura 8 <i>Amplificación de fragmentos de Trypanosoma vivax por TWJ-PCR</i>	46
Figura 9 <i>Amplificación de fragmentos de T. vivax por TWJ-PCR posterior a la aplicación del tratamiento</i>	47

Listado de tablas

Tabla 1 <i>Taxonomía de <i>T. vivax</i></i>	20
Tabla 2 <i>Reactivos y concentraciones utilizados para el gradiente de temperatura de la TWJ-PCR</i>	37
Tabla 3 <i>Condiciones de la TWJ-PCR para gradiente de temperatura</i>	37
Tabla 4 <i>Condiciones de la reacción para TWJ-PCR</i>	38
Tabla 5 <i>Mezcla para la reacción de PCR gradiente de cebadores</i>	38
Tabla 6 <i>Cantidades de cebadores y agua, en microlitros, calculados para el gradiente</i>	39
Tabla 7 <i>Resultados positivos para la prueba de Woo correspondientes al primer muestreo</i> ...	43
Tabla 8 <i>Resultados positivos para la prueba de Woo correspondientes al segundo muestreo</i> ..	44
Tabla 9 <i>Animales positivos para la prueba de Woo previo a la aplicación del tratamiento</i>	44
Tabla 10 <i>Prueba de Normalidad para los datos de temperatura y hematocrito antes y después de la administración del medicamento</i>	48
Tabla 11 <i>Prueba de T Student de muestras relacionadas</i>	48

Lista de abreviatura

ADN	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
μL	Microlitro
μm	Micromolar
mM	Milimolar
pb	Pares de base
Kb	mil pares de base
U/μL	Unidades por microlitro
ng/UI	Nanogramos por microlitro
ISM	Isometamidium
°C	Grados centígrados

Resumen

La tripanosomosis bovina es una enfermedad infecciosa que afecta principalmente a animales del trópico y subtrópico, es transmitida por la mosca tse tsé en África y por los tábanos en América. Esta patología causa grandes pérdidas económicas debido inicialmente al carácter agudo que posee, seguido por un estadio crónico. La fase inicial de la enfermedad se caracteriza por ocasionar fiebre, anemia, debilidad, pérdida de peso y producción, incluso la muerte. En el Ecuador se realizó el primer reporte de *T. vivax* mediante técnicas moleculares en el 2020, donde se evidenció la presencia del parásito en zonas tropicales del país. Debido a que la ganadería es un sector económico muy importante; es necesario el establecimiento de estrategias para el control de la enfermedad y evitar pérdidas significativas en la producción pecuaria nacional. En el país, existen varios medicamentos utilizados para el tratamiento de la tripanosomosis, pero no han sido evaluados debidamente. En este orden de ideas, nos establecimos como objetivo, evaluar un tratamiento a base de Cloruro de Isometamidium para el control de la tripanosomosis bovina. Para ello fue necesario la realización de muestreos en diferentes parroquias de la provincia de Orellana, donde; en un primer muestreo se confirmaron casos positivos a *Trypanosoma spp* mediante pruebas parasitológicas y frotis sanguíneo *in situ*. Habiéndose confirmado animales positivos de tripanosomosis, se realizó un segundo muestreo donde se aplicó el tratamiento específico para *T. vivax* y luego de dos meses, se realizó un tercer muestreo donde se recolectaron muestras sanguíneas de todos los animales a los que previamente se aplicó el tratamiento a fin de evaluar molecularmente la efectividad de este. En total, se muestrearon 186 bovinos, de los cuales 4 resultaron positivos, y dos meses después en el tercer muestreo, resultaron negativos. En este ensayo preliminar del tratamiento de Cloruro de Isometamidium, se demostró la eficiencia a nivel de campo para el tratamiento de la enfermedad. En conclusión, estos resultados aportan insumos importantes para el establecimiento de medidas de control nacional a favor de la producción ganadera del país.

Palabras Clave: • *TRYPANOSOMA vivax* • PCR • Cloruro de Isometamidium.

Abstract

Bovine trypanosomosis is an infectious disease that mainly affects animals in the tropics and subtropics, it is transmitted by the tsetse fly in Africa and by horseflies in America. This pathology causes great economic losses due initially to its acute nature, followed by a chronic stage. The initial phase of the disease is characterized by causing fever, anemia, weakness, loss of weight and production, loss of reproductive abilities and even death. In Ecuador, the first report of *T. vivax* was made using molecular techniques in 2020, where the presence of the parasite in tropical areas of the country was evidenced. Because livestock is a very important economic sector; It is necessary to establish strategies to control the disease and avoid significant losses in the livestock production. That is why, in the country there are several drugs used for the treatment of trypanosomosis. In this order of ideas, we established ourselves as an objective, to evaluate a treatment based on Isometamidium Chloride for the control of bovine trypanosomosis. For this, it was necessary to carry out sampling in different parishes of the Orellana province, where; in a first sampling it was shown positive cases to *Trypanosoma spp* confirmed by parasitological tests and blood smears *in situ*. Having confirmed positive animals for trypanosomosis, a second sampling was carried out where the specific treatment for *T. vivax* was applied and after two months, a third one was carried out where blood samples were collected from all the animals the treatment was previously applied on, to molecularly evaluate its effectiveness. In total, 186 bovines were sampled, of which 4 turned out positive, and two months later in the third sampling, they were negative. In this preliminary trial of the Isometamidium Chloride treatment, the efficiency at the field level for the treatment of the disease was increased. These results provide important inputs for the establishment of national control measures in favor of national livestock production.

Key words: • *TRYPANOSOMA vivax* • PCR • Isometamidium chloride.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La tripanosomosis animal es una enfermedad transmitida biológicamente mediante vectores como la mosca tse tse en África y mecánicamente por los tábanos y otras moscas hematófagas en América. *T. vivax* es un hemoparásito del género *Trypanosoma* subgénero *Duttonella*, que afecta principalmente a los bovinos y ocasiona cuantiosas pérdidas económicas en todo el mundo, se estima que alrededor de 3 millones de animales mueren a causa de tripanosomosis solo en África, esta enfermedad generalmente presenta diferentes síntomas y signos clínicos como son la fiebre, mucosas pálidas, falta de apetito, pérdida de peso, anemia severa, letargo, ictericia y lagrimeo, estos síntomas en conjunto ocasionan la pérdida de la condición del animal, una disminución en su producción y por ende pérdidas económicas; América del Sur se calcula que aproximadamente se pierden aproximadamente 160 millones de dólares al año debido a enfermedades hemoparasitarias (Gonzatti, et al., 2014), esto supone grandes riesgos para el sector ganadero ecuatoriano que es una actividad económica muy importante a nivel nacional.

El primer reporte de *T. vivax* Ecuador fue realizado por Wells et al. (1977) mediante técnicas serológicas donde el 23% del total de muestras analizadas resultaron positivas. Los años posteriores a este descubrimiento se realizaron más investigaciones enfocándose principalmente en *T. cruzi*, hasta el siglo XXI donde Medina-Naranjo et al. (2017) mediante técnicas de inmunodiagnóstico (ELISAi), reportaron la presencia de lo que se presume serían *T. evansi*, *T. theileri* y *T. vivax* en muestras ganado vacuno tomadas de la provincia de Pastaza, obteniéndose una prevalencia del 31 % de 58 animales analizados. Chávez-Larrea et al. (2021) mediante pruebas moleculares confirmaron la presencia de la especie de *T. vivax* en zonas de la provincia de Manabí. Posteriormente, una última publicación realizada por Coello-Peralta et al. (2022) reportaron un 20% de prevalencia en la provincia de Guayas de *Trypanosoma spp.*

A pesar de los estudios publicados y a la prevalencia del hemoparásito en todas las zonas tropicales, actualmente en el país no existe ningún plan de tratamiento en contra de la tripanosomosis bovina y tampoco la libre comercialización de los tratamientos específicos para contrarrestar la enfermedad.

Justificación

Al existir reportes previos que confirman la presencia de *T. vivax* en el territorio ecuatoriano, surge la necesidad de combatir la enfermedad de manera específica, Desquesnes (2004), describe varios compuestos químicos utilizados para el tratamiento de tripanosomosis donde se incluyen medicamentos terapéuticos tales como aceturato de diminazeno, cloruro de homidio y bromuro de homidio; y medicamentos profilácticos como: cloruro de isometamidium y cloruro de homidio (Kasozi, 2022). Sin embargo, en el Ecuador según el Registro de Insumos Pecuarios aprobados por Agrocalidad, solamente se incluye y está registrado para su uso y comercialización el diminaceno, el cual se ha observado que los animales tienden a desarrollar resistencia al medicamento (Gonzatti, 2014). Mientras que el cloruro de isometamidium tiene propiedades profilácticas y terapéuticas por igual, por lo que se recomienda en zonas con alta carga parasitaria siendo el medicamento tripanocida que se usa con mayor frecuencia en el África subsahariana con un 40%, seguido de diminazeno con un 33% y finalmente bromuro de etidio con un 26% (Chitanga, et al., 2011).

Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo de investigación tiene la finalidad de evaluar en la provincia de Orellana, la eficacia del medicamento “Hemoveex” a base de cloruro de isometamidium, en hatos positivos a *T. vivax*, en la provincia de Orellana, el cual promete ser efectivo durante un periodo de hasta 6 meses con una sola dosis, lo que resulta conveniente para los medianos y pequeños productores de la zona.

De manera que se realizaron dos muestreos en las zonas previamente reportadas como positivas en la provincia de Orellana, en el primer muestreo, se extrajo sangre de todos los bovinos pertenecientes a los hatos positivos, con el objetivo de evaluar la prevalencia de la enfermedad mediante técnicas moleculares y posteriormente, se aplicó el medicamento con la dosis recomendada en base al peso del animal, y el segundo muestreo se realizó un mes después de la aplicación del fármaco, donde se volvió a extraer muestras sanguínea de todos los animales analizados al inicio, con el fin de evaluar la eficacia del medicamento para eliminar la tripanosomosis animal.

Objetivos del proyecto

Objetivo general

Evaluar del uso de un medicamento para el tratamiento y el control de la tripanosomosis bovina.

Objetivo específico

Estandarizar la prueba de PCR para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina

Determinar la prevalencia de *T. vivax* mediante PCR en zonas con previos reportes de la enfermedad

Evaluar la eficacia del tratamiento a base cloruro de isometamidium para el control de la tripanosomosis bovina

Hipótesis

El cloruro de isometamidium puede eliminar completamente al *Trypanosoma vivax* de la circulación sanguínea de bovinos infectados.

Capítulo II: Marco teórico

Generalidades

La tripanosomosis bovina causada por *T. vivax* es una enfermedad de distribución mundial, comúnmente conocida como “*Nagana*” en África y *secadera*, *cacho hueco*, *huequera* en América del Sur. Estos términos se deben a la pérdida de condición física que sufren los animales en el estado crónico de esta enfermedad (Rivera, 1996).

Trypanosoma vivax se considera uno de los principales patógenos asociados con la disminución de la producción ganadera en América del Sur (Desquesnes 2004), pero hay una relativa escasez de estimaciones actuales sobre el impacto económico de esta parasitosis en América del Sur y Central (Gonzatti, 2014).

Historia

De acuerdo con Hoare (1972), el *T. vivax* fue observado por primera vez por Ziemann en rumiantes domésticos en Camerún. El primer reporte sobre esta parasitosis en animales en el Nuevo Mundo se ubica en la Guayana Francesa por Leger y Vienne, en 1919 y le asignan el nombre de *T. guyanense* (Shaw y Lainson, 1972).

En América del Sur, esta especie tiene una distribución superpuesta con *T. evansi* (Ventura et al. 2000, 2001). Existen informes donde se confirma su presencia en más de 10 países de Sudamérica, incluidos Colombia, Venezuela, Guayana Francesa, Bolivia, Perú y Brasil (Jones y Dávila, 2001). Shaw y Lainson (1972) reportaron la primera ocurrencia de *T. vivax* en Brasil, en búfalos de agua en el Estado de Pará de la Región Amazónica. *T. vivax* se encuentra comúnmente en equilibrio enzoótico en el Pantanal brasileño y alrededores (Ventura et al. 2001; Davila et al. 2003), aunque reportes indican que *T. vivax* muestra niveles variables de virulencia y patogenicidad distintas dependiendo de la zona donde se encuentre (Gardiner y Mahmoud, 1992).

T. vivax

Trypanosoma (Duttonella) vivax es un importante hemoparásito que afecta tanto a los ungulados salvajes como domésticos (bovinos, búfalos, ovejas y cabras) en África y las Américas (Hoare 1972), se transmite cíclicamente entre rumiantes por vectores en la mayor parte de su área de distribución en África y en los últimos siglos ha llegado a América Central y del Sur (Gardiner, 1989; Gardiner y Mahmoud, 1992).

Taxonomía

La especie de *T. vivax* que es causante de la tripanosomosis bovina, taxonómicamente de acuerdo con lo descrito por Levine, et al., 1980, y Soulsby, 1987, se ubica como se describe a continuación:

Tabla 1

Taxonomía de T. vivax

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	Trypanosoma
Subgénero	Duttonella
Especie	<i>T. vivax</i>

Nota. Obtenido de NCBI, (2020). Taxonomy Browser.

Morfología

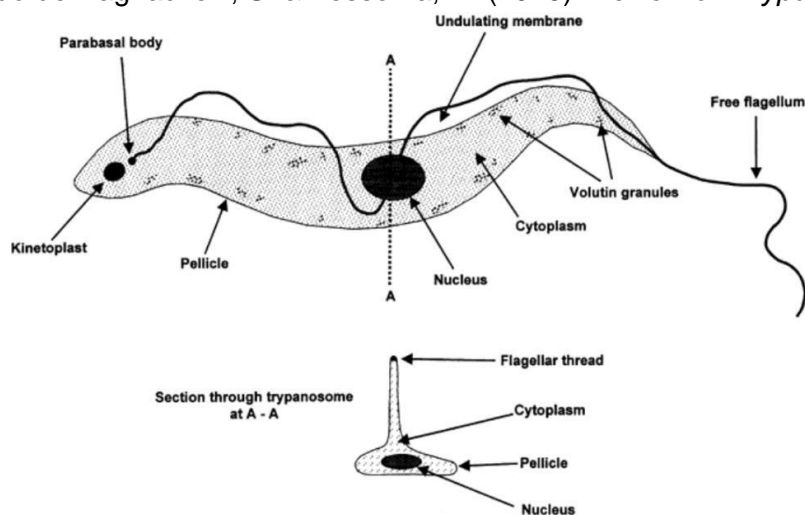
Hoare (1972), señala al subgénero *Duttonella* representado por tripanosomas del grupo *vivax*, están caracterizados por tener un flagelo libre, un extremo posterior redondeado, grande y terminal.

En el torrente sanguíneo, *T. vivax* es un parásito de tamaño mediano con una longitud total de entre 18-31 μm y aproximadamente 1,5-3 μm de ancho, la cepa de *T. vivax* en Sudamérica es ligeramente más pequeña (16-26,5 μm) que su análoga africana. Además, tiene un flagelo libre que va desde 3 a 7 μm , una membrana ondulante que generalmente está atrofiada o tiene un escaso desarrollo, un kinetoplasto grande de 1 μm , a menudo en posición terminal y la región posterior es más ancha y bulbosa (Dequesnes, 2004). Es móvil y activo en sangre fresca, tiene la habilidad de desplazarse velozmente a través del campo microscópico, y es por esta particularidad que se le atribuye su nombre. En los vertebrados, se reproduce por fisión binaria longitudinal (Hoare, 1972; Gardiner, 1989).

Figura 1

Estructura interna de T. vivax.

Nota. Obtenido de Dagnachew, S. & Tessema, M. (2015). Review on *Trypanosoma vivax*.



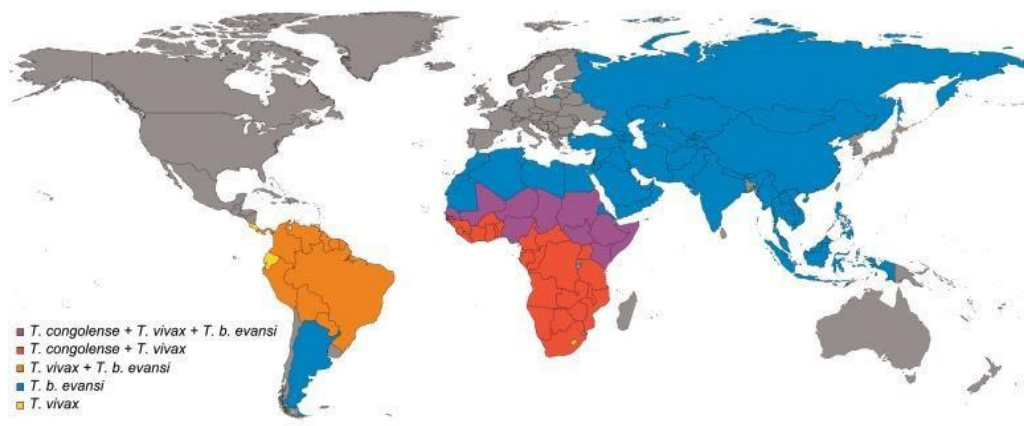
African Journal of Basic & Applied Sciences. 7. 41-64. 10.5829/idosi.ajbas.2015.7.1.92116.

Distribución

La distribución global de *Trypanosoma vivax* varía en función de la presencia de los vectores que transmiten la enfermedad, así como de las medidas de prevención adoptadas por los productores de ganado. Su distribución también se encuentra ligada a factores ambientales y climáticos, como disponibilidad de agua y temperatura. *T. vivax* se ha encontrado en varias regiones, principalmente en tropicales y subtropicales de África, Asia, América Central y América del Sur. Estudios realizados en 27 países africanos han reportado la presencia de protozoarios parásitos de *T. vivax* siquiera en una especie huésped. En 12 de 13 países de Latinoamérica se encontraron infecciones naturales. Se piensa que *T. vivax* llegó a Latinoamérica en ganado importado de África, es posible que en el siglo XVI y se extendió a diferentes países de la región que incluyen a Brasil, Colombia, Panamá, Venezuela y otros países. Otra investigación revisó la presencia de este parásito en Costa Rica, Ecuador, Paraguay y Perú. Es fundamental mencionar que la distribución podría extenderse aún más. *T. vivax* se ha detectado en Argentina solo en 2018 esto puede vincularse a la falta de estudios preliminares sobre la enfermedad (Fetene et al., 2021).

Figura 2

Distribución geográfica de tripanosoma



Nota. Obtenido de Giordani et al., (2016)

Transmisión y ciclo biológico

Los tripanosomas son protozoos flagelados que habitan en el plasma de la linfa y la sangre, además también en varios tejidos. Estos parásitos son principalmente transmitidos por vectores hematófagos, como insectos que transmiten cíclicamente, (chinchas) o mecánicamente (tábanos, stomoxys) (Desquesnes, M. 2004).

La transmisión de la tripanosomosis depende de la ubicación geográfica y de las especies patogénicas. En África, la transmisión de *T. vivax* es esencialmente cíclica debido a la presencia de varias especies de la mosca tse tse del género *Glossina*, incluyendo *G. m. morsitans*, *G. pallidipes*, *G.*, entre otras. Durante la transmisión, el parásito se transforma desde la etapa de tripomastigote a epimastigote en la probóscide, faringe y esófago del vector, hasta finalmente encontrarse en estado críptico inefectivo (Desquesnes, M. y Lamine, M, 2003).

La transmisión mecánica de *T. vivax* se ve afectada por el nivel de parasitemia del vertebrado anfitrión y la eficiencia del vector. Un vector tabanido puede contener de 1 - 12 nanolitros de sangre infectada en las partes mordedoras de la boca. El vector entonces se enfoca en un segundo anfitrión casi inmediatamente e inocular la sangre infectada, favoreciendo la transmisión mecánica de los parásitos que tienen tiempo limitado de supervivencia en las piezas bucales del insecto (Dagnachew, S. Bezie, M. 2015).

El segundo tipo de transmisión le ha permitido a *T. vivax* la propagación más allá de tse tse, pero tiene también implicaciones importantes para el control animal de tripanosomosis. Se demostró que dos especies de tábanos, *Atylotus agriestes* y *Atylotus fuscipes*, transmiten mecánicamente *T. vivax* al ganado bovino en una infección experimental. La importancia relativa de la transmisión mecánica en África aún no se conoce bien, no obstante, la capacidad de *T. vivax* para transmitirse tanto cíclicamente como mecánicamente podría aumentar la posibilidad de que ambas formas de transmisión coexistan en una misma zona, (Gonzatti, et al., 2014).

Signos clínicos

La tripanosomosis bovina presenta síntomas de los cuales resaltan pérdida de peso, aumento de la temperatura, hematocrito bajo, caída de la producción, alteraciones en el sistema reproductivo, ictericia, decaimiento, incluso la muerte (Gonzatti et al., 2014).

La anemia es un signo clínico que caracteriza a la tripanosomosis causada por tripanosomas africanos, así como otras enfermedades parasitarias e infecciones bacterianas (babesiosis, anaplasmosis, helmintiasis gastrointestinal), también viene acompañada de insuficiencia cardíaca congestiva debido a daño miocárdico (Gardiner, 1989).

El período de incubación varía dependiendo de la cepa del parásito y la especie de animal infectada, generalmente en este periodo no se presentan síntomas, inicia con la transmisión por parte del vector al huésped y termina al detectarse los parásitos en la sangre del animal. Este periodo dura de 4 a 6 días postinfección y puede variar debido a la carga parasitaria y la virulencia de la cepa inoculada (Desquesnes, 2004; Rivera, 1996).

Con la aparición de parásitos en la sangre, también comienza el período agudo, donde hay un incremento de la temperatura siendo de los primeros signos de colonización del huésped por el parásito, además se observa un descenso de los eritrocitos en circulación que conlleva a una anemia que puede ser moderada o severa, y también ocurre la aparición de otros signos característicos como el lagrimeo, secreciones nasales, pérdida de peso progresiva, decaimiento, edema submandibular y merma de la producción de leche. La mortalidad en este periodo varía del 3-50% (Desquesnes, 2004; Hoare, 1972; Osorio, et al., 2008).

Después de dos o tres meses de la infección se presenta el periodo conocido como crónico, aquí los animales que sobrevivieron empiezan a recuperar sus parámetros sanguíneos normales y parecen asintomáticos, pero mantendrán la parasitemia críptica (Gonzatti, 2014).

Inmunología

Para poder sobrevivir y colonizar sus huéspedes, los tripanosomas salvarios han adaptado sus mecanismos de defensa en contra del entorno sanguíneo y linfático de los mamíferos. *T. vivax* presenta diferentes fenómenos y complejas variaciones antigénicas, que le permiten realizar picos y recaídas de parasitemia, limitando así una respuesta inmune eficiente por parte del huésped (Rivera, 1996; Urquhart y Holmes, 1987).

Los tripanosomas desarrollan su total ciclo de vida de forma extracelular dentro del huésped mamífero y por lo que están constantemente expuestos a los sistemas inmunitarios innato y adaptativo del mismo (Abbas, et al., 2018). La respuesta inmunitaria temprana, se caracteriza por la inducción de un fuerte perfil proinflamatorio, que incluye la expresión de IFN- γ , factor de necrosis tumoral, IL-6 y la producción de óxido nítrico (Baral, 2010; Bakari, et al., 2017; Mabbott, et al., 1994). En cuanto a sistema adaptativo, provoca una respuesta de células B, lo que estimula la producción de anticuerpos específicos dirigidos a la glicoproteína de superficie variante inmunodominante (VSG) del parásito, y como su nombre lo indica, es la que se encarga de las variaciones antigénicas (Alfituri, et al., 2020).

La reacción antígeno-anticuerpo desencadena mecanismos de defensa del huésped en contra de *T. vivax*, mediante la activación del complemento, que consiste en la formación de un complejo de lisis que destruye al parásito eficientemente con la opsonización y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (MacAskill, et al., 1980). Aunque, pese a estos mecanismos de respuesta, los bovinos tienden a ser susceptibles debido a su incapacidad para controlar la alta parasitemia ya que muestran una respuesta humoral deficiente, principalmente porque las células B de memoria conducen a la producción de anticuerpos poliespecíficos por su inhabilidad de cambiar el isotipo IgM a un isotipo IgG (Authié & Pobel, 1990).

Métodos de diagnóstico

La tripanosomosis bovina causada por *T. vivax* se diagnostica actualmente mediante una combinación de técnicas clínicas, parasitológicas, moleculares y serológicas (Gonzatti, 2014). El diagnóstico clínico se basa principalmente en el reconocimiento de varios signos descritos anteriormente como son: fiebre, anemia, disminución de la productividad, entre otros. Aunque estos signos se utilizan para diagnosticar la fase aguda de la enfermedad, también pueden confundirse con otros hemotrópicos como la anaplasmosis y babesiosis (Hoare 1972; Desquesnes 2004; Osorio et al. 2008).

El diagnóstico serológico de la tripanosomosis animal a menudo se realiza mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA. El ELISA indirecto es un ensayo simple y eficaz que se puede utilizar para cuantificar la presencia de anticuerpos en un gran número de muestras (Reyna-Bello et al. 1998; Osorio et al. 2008).

Diagnóstico parasitológico (Método de Woo)

También llamada técnica de centrifugación de hematocrito es una prueba para el diagnóstico de trypanosoma. Se fundamenta en la separación centrífuga de los componentes sanguíneos, para la visualización de los tripanosomas en la zona leucocitaria.

Este método sigue la siguiente secuencia:

1. Obtención de la sangre en capilares heparinizados.
2. Sellado del tubo.
3. Centrifugación de los tubos a 10000 xg por 5 minutos
4. Visualización de los tubos en microscopio

Al momento de centrifugar los capilares se obtienen tres fases: plasma, capa leucocitaria y eritrocitos. Para poder visualizar los tripanosomas se busca en la zona leucocitaria el movimiento de estos, con ayuda del microscopio a una magnificación de 100x el movimiento de estos. Este proceso es recomendable realizarlo lo antes posible después de la

extracción de la sangre, hasta dentro de las próximas 4 horas, para asegurar que los tripanosomas estén vivos (OMSA, 2021).

La prueba de Woo es considerada mucho más sensible que técnicas de diagnóstico directo, en el caso de *T. vivax* puede tener una sensibilidad del 100% en caso de presentarse una parasitemia en sangre mayor a los 700 tripanosomas/mL, por lo que el diagnóstico será sensible dependiendo de la cantidad de tripanosomas por mL de sangre y del tamaño de estos (OMSA, 2017).

Diagnóstico molecular (PCR)

El diagnóstico molecular se basa en la amplificación de secuencias específicas de muestras de ADN *T. vivax*. En la actualidad esta técnica es ampliamente utilizada debido a su sensibilidad y especificidad, otorgándole precisión al diagnóstico de enfermedades. Para el diagnóstico de *T. vivax*, la PCR puede detectar hasta 1 tripanosoma por cada mililitro de sangre, también se destaca porque posibilita la diferenciación entre especies y subespecies, mediante el uso de cebadores específicos (Gonzatti et al., 2014).

Tratamiento

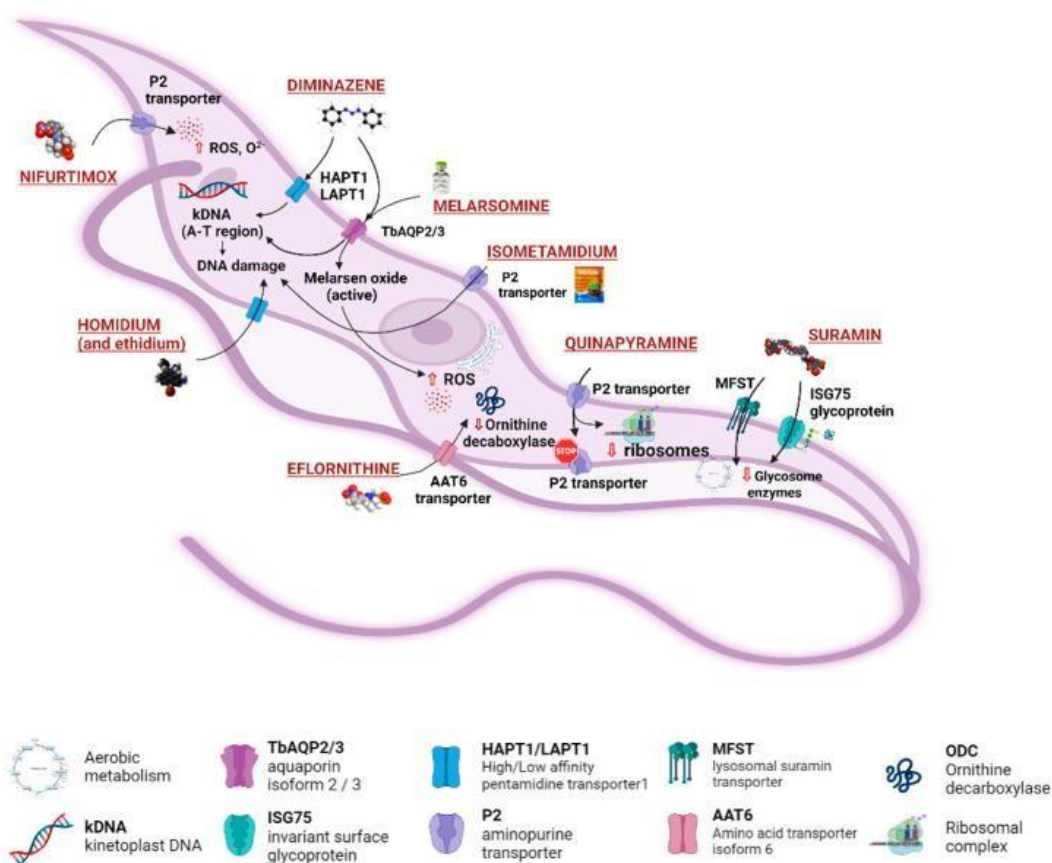
En la actualidad para el tratamiento de la tripanosomosis animal, existen algunos medicamentos como: bromuro de homidio, isometamidio, quinapiramina, diminazeno, suramina sódica y melarsomina, de los cuales el isometamidium es de los más utilizados en regiones donde la tripanosomosis tiene gran impacto, a pesar de que, al igual que el diminazeno, no posee un mayor efecto contra *T. b. evansi* (Giordana, et al., 2016).

Los fármacos utilizados contra la tripanosomosis animal pueden poseer tanto utilidad profiláctica que disminuyen el riesgo de contraer la enfermedad, como terapéutica usados para tratar a los animales una vez infectados. (Venturelli et al., 2022).

En el Ecuador, de los tripanocidas mencionados, tan solo el diminazeno es utilizado por los ganaderos, debido a que es el único que está registrado por Agrocalidad en el listado de fármacos permitidos para su venta y distribución (Agrocalidad, 2022).

Figura 3

Representación gráfica de fármacos para el tratamiento de tripanosomosis animal y mecanismos de acción.



Nota. Obtenido de Venturelli *et al*, 2022.

Cloruro de Isometamidium

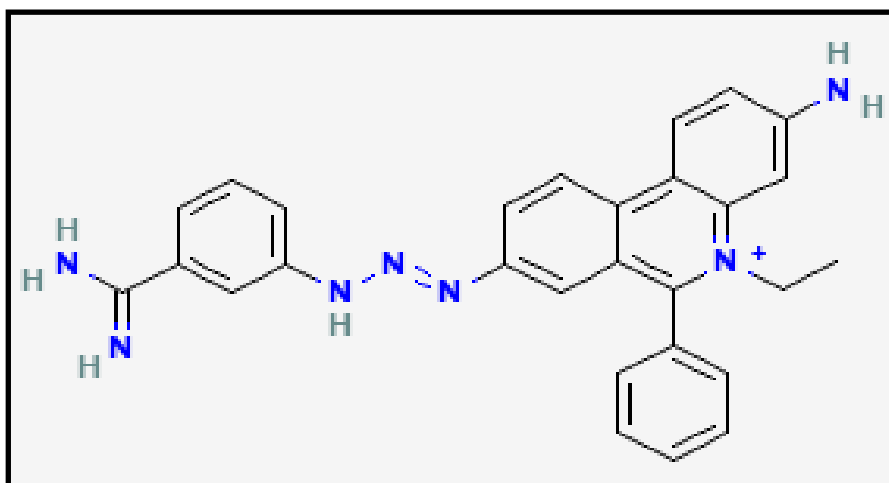
Es un fármaco del tipo de las fenantridinas, tiene propiedades terapéuticas y preventivas usado para tratar la tripanosomosis, a diferencia de otros tripanocidas que sus propiedades son más terapéuticas que profilácticas (Giordana, et al., 2016).

El isometamidium posee características anfífilas y catiónicas, este se elabora combinando homidido con la fracción p-aminobenzamida diazotizada de diminazeno y luego modificarlo con el grupo amidina en la posición meta. Las formulaciones de cloruro de isometamidio incluyen principalmente una mezcla de cuatro compuestos de fenantridina; clorhidrato de cloruro de isometamidio [8-(3-mamidinofenil-2-triazeno)-3-amino-5-etil-6-clorhidrato de cloruro de fenilfenantridinio], el isómero rojo posicional [3-(3-m-amidinofenil-2-triazeno)-8 clorhidrato de cloruro de -amino-5-etil-6-fenilfenantridinio], el isómero azul [clorhidrato de cloruro de 7-(mamidinofenildiazo)-3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio] y de la sustancia disustituida [3,8-di (diclorhidrato de cloruro de (3-m amidinofeniltriazeno)-5-etil-6-fenilfenantridinio] (Kasozi, 2022).

En productos comerciales, está establecido que el isometamidium debe representar por lo menos el 55% del producto total, por lo que el resto de los componentes deben estar presentes (Sutcliffe *et al.* 2014).

Figura 4

Representación gráfica de la estructura química del cloruro de isometamidium.



Nota: Obtenido de: NCBI, (2023)

Farmacología

El mecanismo de acción con el que actúa el isometamidium no está completamente descrito, sin embargo el principal modo de acción actualmente considerado para explicar los mecanismos moleculares de la actividad antitripanosómica de los fármacos de fenantridinio, es el bloqueo de la replicación y/o síntesis del ADN a través de la intercalación entre pares de bases de los ácidos nucleicos, la inhibición de la ARN y ADN polimerasa, y la incorporación de precursores de ácidos nucleicos en el ADN y el ARN (Kinabo, 1993). Además, hay otras reacciones bioquímicas como la modulación de biosíntesis de glicoproteínas, el metabolismo de lípidos, el transporte de membrana y la escisión selectiva de minicírculos de ADN del kinetoplasto, en las que actúa el fármaco.

Dentro de estos el mecanismo que mayor explica su toxicidad selectiva es el bloqueo de la síntesis de ADN, modifica la membrana mitocondrial, la estructura de las glicoproteínas en la superficie del retículo endoplasmático y es excretado (Shiferaw *et al.*, 2015).

Dosificación

La dosis va a depender de la concentración en la que se encuentre el producto que se vaya a utilizar, el cloruro de isometamidium está disponible en diferentes presentaciones comerciales, por lo general para bovinos se suele administrar 1 mL de solución por cada 50 kg de peso vivo (24 mg/mL de cloruro de isometamidium y 20 mg/mL de Ivermectina) en dosis única (AVISA, 2019).

Capítulo III: Materiales y Métodos

Participantes

El presente trabajo de integración curricular fue llevado a cabo por Lissette Melissa Viscarra Sánchez, estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, bajo el asesoramiento y dirección técnica y científica del Dr. Armando Reyna Bellos, PhD, docente-investigador de la Universidad de las Fuerzas ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas y el apoyo del Ing. Fausto Bedoya, técnico del laboratorio de Biología Molecular de la sede.

El presente trabajo además fue realizado con el apoyo del proyecto de vinculación e investigación: “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)” financiado por la ARES de Bélgica y contó también con el apoyo de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario - Agrocalidad.

Zona de estudio

La fase de campo se llevó a cabo en seis parroquias rurales de la provincia de Orellana; San José de Guayusa, Dayuma, Nuevos Horizontes, Nuevo Paraíso, La Belleza e Inés Arango, a partir de las cuales se obtuvieron las muestras de sangre bovina necesarias para la realización de este estudio.

Por otro lado, la fase de análisis se realizó en laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, ubicado en la Vía Quevedo km 24. Sus coordenadas geográficas son: latitud 0°24'45.2" S y longitud 79°18'34.1" O.

Duración de la investigación

El trabajo de integración curricular tuvo una duración de 4 meses. El cual comenzó en el mes de octubre de 2022 y terminó en febrero de 2023.

Fármaco utilizado

Se aplicó el medicamento tripanocida de nombre comercial “Hemoveex”, cuya formulación es a base de cloruro de isometamidium específico para el control de *T. vivax*, además de ivermectina para el control principalmente de parásitos externos.

Fase de Campo

Se realizaron un total de 3 muestreos en diferentes zonas de la provincia de Orellana y en distintas fechas, obteniéndose 72 muestras de sangre bovina en el primer muestreo, el cual tuvo la finalidad de confirmar casos positivos a tripanosomosis mediante pruebas parasitológicas como Woo. Habiéndose confirmado casos positivos mediante la prueba de Woo, se realizó un segundo muestreo donde se obtuvieron 115 muestras de sangre bovina y se aplicó un medicamento profiláctico específico para *Trypanosoma vivax* a base de cloruro de isometamidium a todos los animales muestreados exceptuando a las vacas lecheras debido a que el medicamento contenía también ivermectina. Posteriormente, se realizó el tercer y último dos meses después de la aplicación del tratamiento, donde fueron recolectadas en totalidad 73 muestras de sangre bovina, las mismas que correspondían a los animales que se les había aplicado el medicamento en el segundo muestreo. Todas las muestras de los tres muestreos fueron procesadas *in situ*, con la finalidad de analizar el grado de parasitemia mediante la prueba de Woo. Finalmente, las muestras se transportaron al Laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal, sede matriz para la correspondiente extracción de ADN. Más tarde los ADN's obtenidos se trasladaron al Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE SD para ser procesados mediante pruebas de diagnóstico molecular.

Obtención de muestras sanguíneas de ganado bovino

Para la recolección de muestras de sanguíneas se utilizó la técnica de venopunción coccígea, para la cual en primer lugar se identifican/rotularon los tubos donde se recolectó el material sanguíneo, se inmovilizó en lo posible al animal, se procedió a limpiar la zona de la

extracción, se localizó la vena coccígea media de la cola con la ayuda del dedo pulgar, la literatura describe al que se ubica al nivel del espacio entre las vértebras coccígeas 6 y 7, se introdujo la aguja calibre 21 entre 8 a 12 mm de profundidad, en el punto ya localizado y se recolectó la sangre en tubos con anticoagulante (EDTA), se mezcló la sangre y el anticoagulante al invertir el tubo varias veces (Agrocalidad, 2018).

Prueba de Woo para el diagnóstico parasitológico

De las muestras sanguíneas que contenían anticoagulante, se colocaron alrededor de 70 μ l de sangre en capilares heparinizados (75 x 1,5 mm), se selló el extremo seco del tubo con plastilina, y con éste orientado hacia abajo, se centrifugó a 10000 rpm durante 5 min. Se colocó el capilar sobre el microscopio con un objetivo de 10X y se observó a nivel de la zona leucocitaria (franja blancuzca), donde se concentran los parásitos.

Extracción de ADN de sangre de muestras de ganado bovino

El ADN genómico contenido en la sangre fue extraído de dos maneras, mediante el protocolo de GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific), que se describe a continuación:

En un tubo de 1.5 ml se añadió 200 μ L de sangre anticoagulada, 20 μ L de proteinasa Ky 400 μ L de solución de lisis, se da un vórtex hasta obtener una solución homogénea y se incubó las muestras por 10 minutos a 56°C con agitación en el thermoshaker. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de etanol absoluto, se homogeneizó mediante un vórtex y se transfirió la solución a una columna de purificación.

Se centrifugó (1 min a 8000 rpm) y se descartó el tubo de colección y se dispuso la columna en otro tubo limpio, luego se añadió 500 μ L de Wash Buffer I y se centrifugó (1 min a 10000 rpm), se descartó el sobrenadante del tubo de colección y se volvió a colocar la columna en el mismo. Se añadieron 500 μ L de Buffer Wash II en la columna y se centrifugó durante 3 min a máxima velocidad (14000 rpm), se transfiere la columna a un nuevo tubo de 1.5 mL.

Se añadieron 50 μ L de Buffer de elución, se dejó incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm, se repitió el proceso añadiendo 25 y 12.5 μ L correspondientemente. Se descartó la columna de purificación y se almacenó el ADN a -20 °C.

Además, la extracción de ADN total de sangre también fue realizada a partir de un protocolo modificado de Riera, Rojas, & Zapata., (2010), el cual se describe a continuación:

Se transfirieron 500 μ L de sangre con EDTA a un tubo eppendorf de 1,5 μ L. Se añadió 540 μ L de Buffer GR (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], Tritón X-100 1% y sacarosa 600 Mm) y se homogeneizó mediante agitación con vórtex durante 1 min. Posteriormente se centrifugó durante 3 min a una velocidad de 13000 rpm, transcurrido el tiempo se procedió a descartar el sobrenadante y se repitieron los dos últimos pasos hasta obtener un sobrenadante claro.

Se añadieron 180 μ L de buffer GB (Tris-HCl 10 mM [pH 8.0], NaCl 400 mM y EDTA 2 mM), 20 μ L de proteinasa K (20 mg/mL) y 6 μ L de SDS al 20% y se llevó a vórtex durante 1 min o hasta obtener una mezcla homogénea. Después se incubó en baño maría durante mínimo 2 horas a una temperatura de 56°C, posteriormente se dejó enfriar las muestras a temperatura ambiente.

Se añadió 90 μ L de AcK (acetato de potasio) 3M, se homogeneizó suavemente invirtiendo el tubo y se procedió a centrifugar por 5 min a 13000 rpm. Con la ayuda de una micropipeta se recuperó el sobrenadante y se dispensó en un nuevo tubo de 1.5, se repite el paso 6 y 7 hasta obtener un sobrenadante limpio.

Se añadieron 600 μ L de etanol absoluto (-20 °C) y se incubó a -20 °C durante 30 min o toda la noche. Posterior a este tiempo, se centrifugó por 5 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta cuidando de no tomar el pellet, y este se lavó con 100 μ L de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar durante 5 min a una velocidad de 13000 rpm y se desechó el sobrenadante con ayuda de una micropipeta, cuidando de no tomar el pellet.

Finalmente se dejó secar el pellet a 37 °C, una vez seco se resuspendió con 50 µL de Buffer TE y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se almacena a -20 °C hasta su uso.

Verificación de ADN extraído en electroforesis horizontal

La calidad e integridad del ADN extraído a partir de los dos protocolos antes descritos se determinó a través de electroforesis en gel de agarosa. En el caso del uso del kit de Thermo Scientific, tanto la extracción como la visualización del ADN se realizó en el laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal sede matriz, en donde se preparó un gel de agarosa al 0,8% (p/v) y se tiñó con SYBR® Safe DNA Gel Stain, se cargaron 2 µL de ADN y 1 µl de buffer de carga Blue Juice en cada pocillo, se corrió el gel a 100 voltios durante 45 minutos y se observó en el equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (BioRad). Mientras que el protocolo modificado de Riera, Rojas, & Zapata., (2010) y la visualización de la extracción de ADN se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular sede Santo Domingo, en donde de igual manera se preparó un gel de agarosa al 0,8% (p/v) pero este fue teñido con Bromuro de Etidio, se cargaron 2 µL de ADN y 1 µl de buffer de carga Blue Dextran en cada pocillo, se corrió el gel a 100 voltios durante 45 minutos y se observó en el equipo ClearView UV Transilluminator (Clever Scientific).

Estandarización de la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) específico para *Trypanosoma vivax* mediante TWJ.

En cuanto a la estandarización de la prueba PCR para la detección específica de *T. vivax*, se tomaron en cuenta dos variables a estandarizar, la concentración de los cebadores y la temperatura de hibridación. Para cada una de las variables se realizaron distintos ensayos donde se fluctuaban sus valores hasta alcanzar las condiciones favorables, es decir, se llevó a cabo un gradiente de temperatura de hibridación y de concentraciones de cebadores.

Se utilizó un control positivo para el proceso de estandarización el cual correspondía la

muestra de ADN “SaBo-214” proveniente del Napo la cual fue confirmada como positiva a *Trypanosoma vivax* mediante TviCatL-PCR por una previa investigación de Chávez-Larrea et al., 2020.

Se emplearon los cebadores descritos por Masake et al., (1997) cuya secuencia es TWJ: F 5' -CAGCTCGGCGAAGGCCACTTGGCTGGG-3'; R 5' -

TCGCTACCACAGTCGCAATCGTCGTCTCAAGG-3' los cuales amplifican un fragmento 400 pb dirigido al gen que codifica el antígeno específico de *T. vivax*.

Para el cálculo de la temperatura de hibridación se utilizó la herramienta T_m Calculator del sitio web de ThermoScientific, en donde se introducen la secuencia de los cebadores a ser utilizados y el valor proporcionado por el programa se toma como referencia para realizar el gradiente, la temperatura de hibridación no debe exceder el mismo, el proceso del gradiente de temperatura se describe a continuación.

Gradiente de temperatura de hibridación

Para el gradiente de temperatura de hibridación se partió desde 54 hasta 62 °C incrementando la temperatura en 2°C. Se calculó la reacción para un total de 6 muestras correspondientes a las temperaturas de 54, 56, 58, 60, 62 °C y el control negativo, con un volumen final de 25 µL. Se preparó un máster mix de 144 µL con las concentraciones descritas en la Tabla 1, para el control negativo se dispensaron 24 µL del máster mix en un tubo de 0.2 mL y se añadió 1 µL de agua ultrapura en lugar de la muestra de ADN, y al restante de 120 µL del máster mix se le añadieron 5 µL de la muestra de ADN positiva para *T. vivax* “SaBo-214”, se dispensaron 25 µL en 5 tubos de 0.2 mL y se llevaron al termociclador donde se programó las condiciones de la reacción de PCR y también el incremento de la temperatura de hibridación para el respectivo gradiente, descritas en la Tabla 2.

Tabla 2

Reactivos y concentraciones utilizados para el gradiente de temperatura de la TWJ-PCR.

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (μL)
H ₂ O	μL	N/A		110,40
Buffer	X	10,00	1,00	15,00
MgCl ₂	mM	25,00	1,50	9,00
TWJ-F	μM	10,00	0,20	3,00
TWJ-R	μM	10,00	0,20	3,00
dNTPs	μM	40,00	0,80	3,00
GoTaq Flexi DNA Polymerase	U/ μL	5,00	0,50	0,60
ADN	ng/ μL	100	100	6,00
Total				

Nota: μL : microlitro; μM : micromolar; mM: milimolar; U/ μL : unidades por microlitro; ng/ μL : nanogramos por microlitro; dNTPs: mezcla de desoxinucleótidos.

Tabla 3

Condiciones de la TWJ-PCR para gradiente de temperatura

Proceso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	35
Hibridación	54-62 (variando 2 $^{\circ}\text{C}$)	1	35
Extensión	72	1	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	-

Nota: $^{\circ}\text{C}$: grados centígrados; min: minutos.

Una vez realizado el gradiente y al haber establecido la temperatura de hibridación más favorable, se realizó el gradiente de los cebadores con estas condiciones de reacción, las cuales se describen en la Tabla 3.

Tabla 4*Condiciones de la reacción para TWJ-PCR*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	1	35
Hibridación	60	1	35
Extensión	72	1	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	-

Nota: °C: grados centígrados; min: minutos.

Gradiente de cebadores

Además, para la estandarización de la prueba PCR se realizó también un gradiente de cebadores o primers específicos para la detección de *T. vivax*, denominados TWJ-F y TWJ-R, para lo cual se determinó que se probarían diferentes concentraciones de estos y se estableció que las concentraciones a probar serían las siguientes: 0,1- 0,2- 0,4 y 0,6 μM . Se realizó una prueba de PCR para un total de 5 muestras, incluido un control negativo, en donde se preparó un máster mix excluyendo los cebadores y el agua, como se describe en la Tabla 4.

Tabla 5*Mezcla para la reacción de PCR gradiente de cebadores.*

Reactivos	Unidad	Stock	Concentración final	Volumen (μL)
Buffer	X	10,00	1,00	12,50
MgCl₂	mM	25,00	1,5	7,50
dNTPs	μM	40,00	0,8	2,50
GoTaq Flexi DNA Polymerase	U/ μl	5,00	0,5	0,50
ADN	ng/ μl	100	100	5,00

Nota: μL : microlitro; μM : micromolar; mM: milimolar; U/ μL : unidades por microlitro; ng/ μL : nanogramos por microlitro; dNTPs: mezcla de nucleótidos.

El volumen total del máster mix excluyendo los parámetros antes mencionados y el ADN fue de 23,00 μL los cuales se dividieron para un total de 5 muestras, es decir, 4,6 μL paracada muestra, se dispensó este valor en un tubo de 0,2 mL y se añadieron las cantidades de agua y cebadores correspondientes a 0,2 μM de concentración y se añadió 1 μL de agua ultrapura como control negativo. En los 18,4 μL de máster mix restantes se añadieron 4 μL de ADN de la muestra positiva “SaBo-214”, se mezcló por pipeteo y se dispensaron 5,6 μL de la mezcla en 4 tubos de PCR. Posteriormente en estas últimas se añadieron las cantidades de agua y cebadores de acuerdo con los cálculos descritos en la Tabla 5 para lograr las condiciones esperadas. La reacción en el termociclador se estableció de acuerdo con las condiciones descritas anteriormente en la tabla 3.

Tabla 6

Cantidades de cebadores y agua, en microlitros, calculados para el gradiente.

Reactivos	Concentración de cebadores (μM)			
	0,6	0,4	0,2	0,1
Mezcla de reacción	5,60	5,60	5,60	5,60
TWJ-F	1,50	1,00	0,50	0,25
TWJ-R	1,50	1,00	0,50	0,25
H₂O	16,40	17,40	18,40	18,90
Total (μl)	25	25	25	25

Nota: μL : microlitro; μm : micromolar.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa.

Para la preparación del gel de agarosa al 1.5 % se pesó 0.75 g de agarosa en una balanza analítica y se colocó en un Erlenmeyer de 100 ml, se agregó 50 ml de TAE al 1X y se dejó en agitación durante 10 minutos. Se calentó la solución en un microondas hasta hervir, se detuvo el calentamiento y se volvió a calentar, hasta que se obtuvo una solución completamente transparente.

Una vez la solución esté tibia, se agregó 5 μl de BrEt, se volvió a agitar por 2 min más y

se agregó la solución a la cámara de electroforesis. Se dejó solidificar a temperatura ambiente, una vez solidificado el gel se sumergió en suficiente cantidad de Buffer TAE 1X, cargaron los productos de PCR y se añadió el marcador de peso molecular. Se dejó correr conectando a una fuente de poder a 100 voltios durante 45 min y se observó el gel utilizando ClearView UV Transiluminator (Clever Scientific).

Prevalencia

La prevalencia se calculó a partir de la fórmula 1, la cual fue obtenida de a partir de lo descrito por Tapia (1995).

Fórmula 1.

Fórmula para encontrar la prevalencia de una población.

$$P = \frac{\text{Número de casos positivos}}{\text{Total de la población}} \times 100$$

Análisis estadístico

El análisis estadístico y gráficos se realizaron mediante el programa IBM SPSS Statistiscs, para lo cual se utilizó la prueba de Normalidad, Shapiro-Wilk, la cual ayudó a establecer el uso de una prueba de T Student de muestras relacionadas, con una significancia de 0.05. Para ello se tomaron los valores de las variables “temperatura” y “hematocrito”, antes y después de la aplicación del tratamiento con el fin de establecer si son variables asociadas para suponer una infección por *T. vivax*.

Capítulo IV: Resultados

Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras sanguíneas de bovinos obtenidas a partir de las diferentes salidas de campo se realizó por dos métodos; un protocolo casero modificado de Riera et al., (2010) y siguiendo el inserto de GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific), mediante los cuales se logró extraer ADN a un total de 261 muestras de sangre bovina provenientes de los tres muestreos realizados en diferentes fechas en la provincia de Orellana. El ADN extraído se observó en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, como se muestra en la Figura 5 se aprecian bandas intensas, mientras que en la Figura 6A se aprecia un gel con bandas más tenues y en la Figura 6B se encuentran bandas de intensidad media, baja e inexistentes.

Figura 5

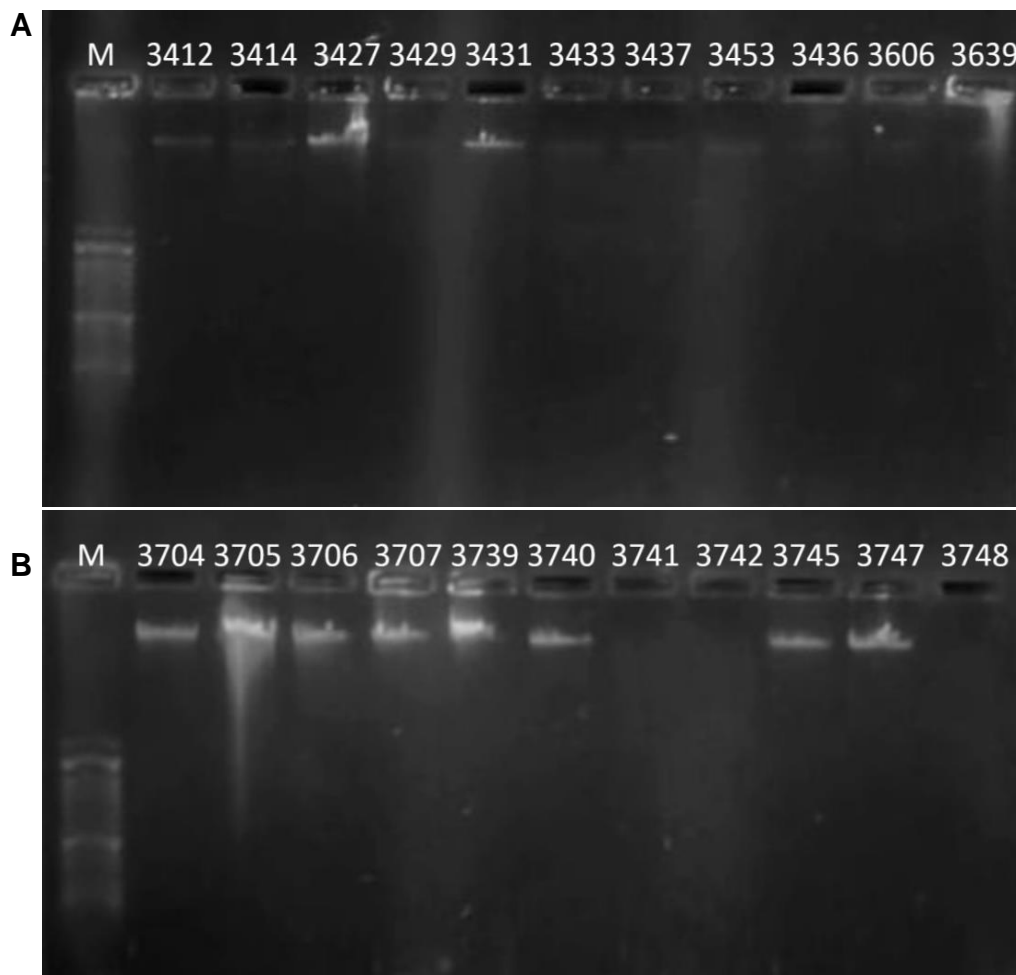
Extracción de ADN con GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific).



Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se cargaron 2 μ L de ADN en cada carril exceptuando el primero que corresponde al marcador de peso molecular (M) 100bp Opti-DNA Marker (abm), el ADN extraído corresponde a las muestras del segundo muestreo.

Figura 6

Extracción de ADN a partir del protocolo casero



Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Se cargaron 2 μ L de ADN en cada carril exceptuando el primero que corresponde al marcador de peso molecular (M) 100bp Opti-DNA Marker (abm), el ADN extraído corresponde a las muestras provenientes del tercer muestreo. Modificado de Riera, Rojas, & Zapata., (2010)

Prueba de Woo y hematocrito

En el primer muestreo se obtuvieron 13 casos positivos para la prueba Woo de un total de 72 muestras de sangre bovina analizadas y de estas, 3 muestras presentaron un hematocrito menor a 24%, estos resultados se detallan en la Tabla 6.

En el segundo muestreo se recolectaron un total de 114 muestras sanguíneas, encontrándose 2 muestras positivas a Woo y tan solo una de estas presentaba un hematocrito menor a 24%, además a todos los animales, exceptuando a aquellos cuyos productos se destinaban al consumo humano, se les aplicó el tratamiento específico para *T. vivax*, estos datos se detallan en la Tabla 7. El tercer y último muestreo se realizó 2 meses después de la aplicación del tratamiento, en este volvieron a tomar las muestras de aquellos animales que habían sido previamente tratados, obteniéndose un total de 75 muestras de las cuales, ninguna resultó ser positiva para Woo.

El total de animales positivos previo al tratamiento se describe en la Tabla 8.

Tabla 7

Resultados positivos para la prueba de Woo correspondientes al primer muestreo.

Código único.	Temperatura	Hematocrito	Woo
Sabo-3298	38,9	32	Positivo
Sabo-3339	37,9	32	Positivo
Sabo-3409	39,5	32	Positivo
Sabo-3414	39,4	35	Positivo
Sabo-3427	39,1	26	Positivo
Sabo-3433	41,1	14	Positivo
Sabo-3443	37,3	18	Positivo
Sabo-3444	37,6	21	Positivo
Sabo-3456	39,6	29	Positivo
Sabo-3465	38,5	31	Positivo
Sabo-3467	38,6	33	Positivo
Sabo-3474	38,4	36	Positivo
Sabo-3475	38,8	41	Positivo

Nota: Valores de temperatura en °C y hematocrito en %.

Tabla 8

Resultados positivos para la prueba de Woo correspondientes al segundo muestreo.

Código único.	Temperatura	Hematocrito	Woo
Sabo-3653	37,9	16	Positivo
Sabo-3680	39,3	32	Positivo

Nota: Valores de temperatura en °C y hematocrito en %.

Tabla 9

Animales positivos para la prueba de Woo previo a la aplicación del tratamiento.

Salidas de Campo	Animales muestreados	Woo	
		(n)	%
Primer muestreo	72	13	18.05
Segundo muestreo	114	2	1.75
Total	186	15	

Nota: Detalle de las salidas de campo y los resultados de Woo.

Estandarización de la prueba de PCR

La estandarización de la prueba de PCR para la amplificación de un fragmento de 400 pb que codifica el gen del antígeno específico de *T. vivax*, se realizó a partir de un gradiente para la temperatura de hibridación y otro gradiente de concentración de cebadores. En el caso del gradiente de temperatura de hibridación se determinó que la temperatura más favorable se encuentra en los 60 °C ya que como se observa en la Figura 7A, presenta baja presencia de bandas no específicas además de ser una banda bastante definida y posicionarse ligeramente debajo de la banda de 500 pb por lo que se estima que cuenta con alrededor de 400 pb como se esperaba.

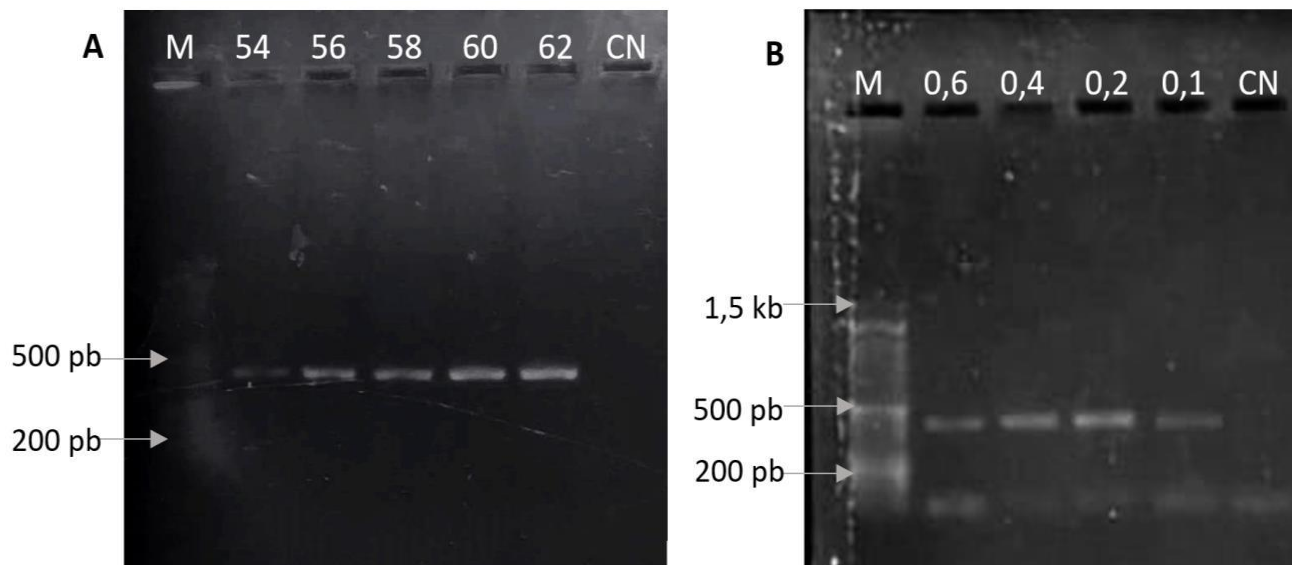
En cuanto al gradiente de concentración de cebadores se obtuvo como resultado que la concentración de 0,2 µM es la más adecuada para la reacción de PCR, ya que como se

observa en la Figura 7B, es la banda más intensa, está bien definida, no presenta bandas inespecíficas, y además de que se sitúa dentro de los esperado para obtener un fragmento de 400 pb.

Figura 7

Gradientes de la estandarización de la TWJ-PCR

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se cargaron 10 µl de producto PCR en



cada carril y se utilizó el primero para el marcador de peso molecular (M) 100bp Opti-DNA Marker (abm). Figura 7A: Gradiente de temperatura, muestras del carril 2 - 6 en °C. carril 6: control negativo (CN). Figura 7B: gradiente de cebadores, muestras del carril 2 - 5: concentraciones de cebadores TWJ-F y TWJ-R en µM. Carril 5: control negativo (CN).

La reacción en cadena de la polimerasa se estandarizó con un total de 25 µL de volumen final, compuesto por Green Buffer 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0,2 µM de cada cebador, dNTP 0,8 mM, 0,5 U de GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) y 100 ng de ADN. Las condiciones de la reacción térmica consistieron en las siguientes etapas: desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 60 segundos, hibridación a 60°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos, y extensión final de 72° C durante 10 minutos.

Diagnóstico y prevalencia de *T. vivax*

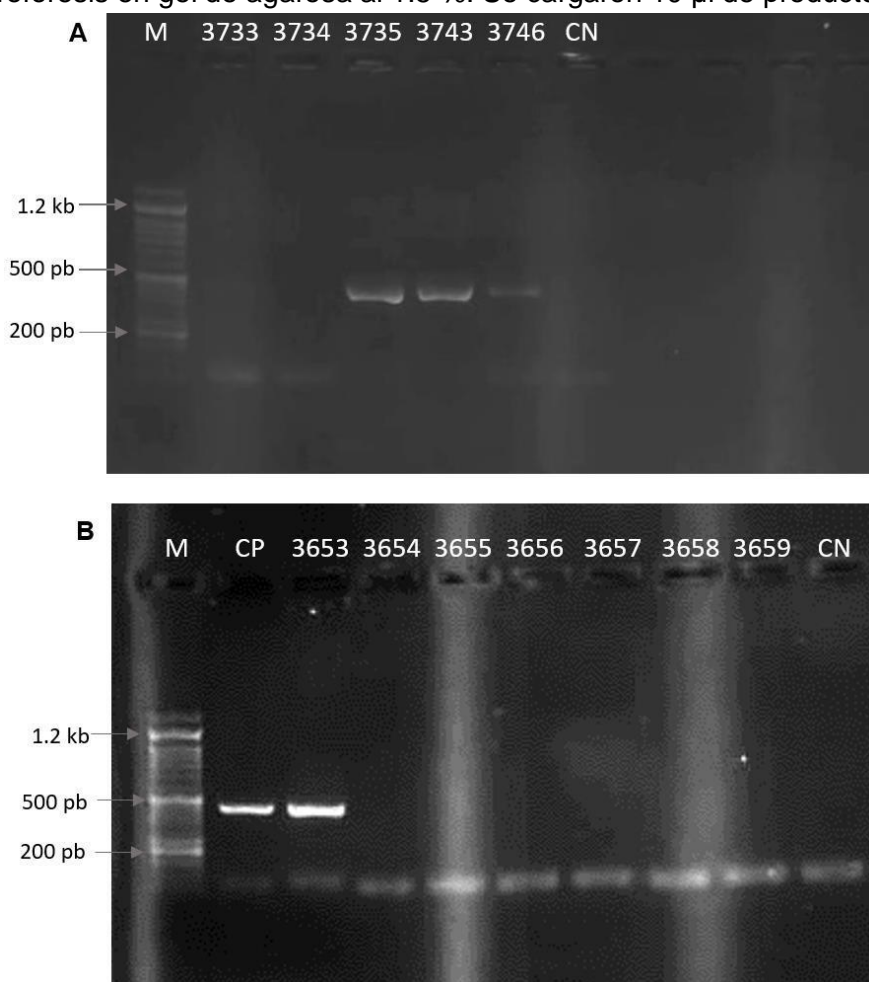
En cuanto al diagnóstico mediante pruebas moleculares se encontró que de las 186

muestras analizadas previo a la aplicación del tratamiento 4 resultaron positivas para *T. vivax* mediante TWJ-PCR, obteniendo una prevalencia de 2.15%.

Figura 8

Amplificación de fragmentos de Trypanosoma vivax por TWJ-PCR

Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se cargaron 10 µl de producto PCR en cada



carril y se utilizó el primero para el marcador de peso molecular (M) 100bp Opti-DNA Marker en ambos geles. Figura 8A: Muestras de ADN del carril 2 al 6. Carril 7: control negativo (CN).

Figura 8B: Carril 2: control positivo (CP). Muestras de ADN del carril 3 al 9. Carril 10: control negativo (CN).

Las muestras 3653, 3735, 3743 y 3746 resultaron positivas para *T. vivax*, logrando amplificar un fragmento de alrededor de 400 pb mediante el uso de los cebadores TWJ-F y

TWJ-R en la prueba de PCR, como se observa en la Figura 8.

Eficacia del tratamiento

Dos meses después de la aplicación del tratamiento para el control de la tripanosomosis bovina se evaluaron nuevamente las muestras que anteriormente resultaron positivas mediante TWJ-PCR, obteniéndose esta vez resultados negativos como se observa en la Figura 9, comprobando así la eficacia del medicamento para el control del hemoparásito *T. vivax*.

Figura 9

Amplificación de fragmentos de T. vivax por TWJ-PCR posterior a la aplicación del tratamiento



Nota: Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se cargaron 10 μ l de producto PCR en cada carril. Carril 1: marcador de peso molecular (M) 100bp Opti-DNA Marker. Carril 2: control positivo (CP). Muestras de ADN del carril 3 al 5. Carril 6: control negativo (CN).

Análisis estadístico

Para los valores tanto de temperatura como de hematocrito, antes y después del tratamiento se obtuvo una distribución normal de los datos al obtenerse una significancia mayor al 0.05, como se observa en la Tabla 9, por lo que se acepta la *Ho*.

Tabla 10

Prueba de Normalidad para los datos de temperatura y hematocrito antes y después de la administración del medicamento

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
TEMP_ANTES	,912	10	,293
TEMP_DESPUÉS	,904	10	,245
HTC_ANTES	,962	10	,808
HTC_DESPUÉS	,910	10	,281

Nota: tabla obtenida directamente de IBM SPSS Statistics

Por medio de la prueba de T Student de muestras relacionadas, se determinó que los valores de hematocrito que presente un animal no son suficientes para suponer una infección por *T. vivax* debido a que la significancia es mayor a 0.05 por lo que se acepta la *Ho*. Mientras que en cuanto a la temperatura se determinó que sí es una variable que asociar con una infección por *T. vivax*, al obtener una significancia menor que 0.05, rechazando la *Ho*.

Tabla 11

Prueba de T Student de muestras relacionadas

		Prueba de muestras emparejadas						Significación		
		Diferencias emparejadas				t	gl	P de un factor	P de dos factores	
		Media	Desv. estándar	Media de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia					
					Inferior	Superior				
Par 1	HTC_ANTES - HTC_DESPUÉS	-3,50000	5,12619	1,62104	-7,16705	,16705	-2,16	9	,030	,059
Par 2	TEMP_ANTES - TEMP_DESPUÉS	,78000	,87407	,27641	,15473	1,40527	2,822	9	,010	,020

Nota: tabla obtenida directamente de IBM SPSS Statistics.

Capítulo V: Discusión

Mediante el presente estudio, se pudo confirmar a través de pruebas parasitológicas y moleculares la presencia de tripanosomosis bovina causada por el hemoparásito *T. vivax*, en diferentes zonas de la provincia de Orellana. Posteriormente, en esta misma población se probó el medicamento a base de cloruro de isometamidium sobre aquellos animales positivos, demostrando que, luego de dos meses, estos animales resultaron negativos, comprobándose así la eficacia del medicamento para el tratamiento y control de la tripanosomosis bovina ocasionada por *T. vivax*.

Por otro lado, también se logró estandarizar la prueba de PCR mediante gradientes de concentración de cebadores y de temperatura de hibridación, estableciéndose que 0,2 μM y 60 °C respectivamente fueron las condiciones óptimas para la reacción. Además, se evaluaron dos métodos de extracción de ADN y se encontró que mediante el protocolo de GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) se obtuvieron mejores resultados en cuanto a concentración y calidad del ADN.

El protocolo modificado de Riera et al., (2010) fue utilizado en este estudio para la extracción de ADN de 75 muestras de células sanguíneas, empero, este resultó ser deficiente en comparación al protocolo del kit comercial GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific), ya que en el primero fue poco eficiente y poco consistente, debido que las muestras de ADN mostraron bandas de ADN degradado, muy débiles o incluso inexistentes tal y como se observa en la Figura 6, esto pudiera indicar la presencia de impurezas y poca cantidad de ADN extraído. Generalmente la sal es la impureza más común de la extracción de ácidos nucleicos y se requiere que se elimine mediante procesos de separación y/o purificación para desalinizar la muestra a ser utilizada posteriormente (Tan & Yiap, 2009), al incluir cloruro de sodio en el proceso de extracción del protocolo Riera et al., (2010) podría sugerir que las impurezas son provenientes de este compuesto.

El kit comercial de Thermo Scientific que se utilizó para extraer el ADN de 186 muestras de sangre bovina, demostró ser más efectivo para obtener el material genético, ya que la presencia de degradación fue mínima, es decir, existe baja presencia de impurezas y de degradación y, por otro lado, la alta intensidad de las bandas sugiere una buena cantidad y calidad del ADN (Figura 5), además de ser el protocolo más rápido.

Tan y Yiap (2009) mencionan que la automatización en procesos de extracción de ácidos nucleicos mediante kits comerciales es potencialmente beneficiosa ya que reduce el tiempo de trabajo, disminuye los costos de mano de obra y aumenta la seguridad del personal, al mismo tiempo, brinda la oportunidad de aumentar la reproducibilidad y la calidad de los resultados. La verificación en ambos protocolos de la integridad del ADN fue cualitativa, por lo que no se pudo cuantificar el material genético obtenido de manera precisa en cada muestra. Generalmente para determinar la calidad y cantidad de ADN proveniente de una extracción con precisión se requiere el uso de métodos de cuantificación sensible como espectrofotometría o fluorescencia (Robin et al., 2016).

De las 186 muestras analizadas previo a la aplicación del tratamiento, se obtuvieron un total de 15 animales positivos para la prueba de Woo, es decir el 8.06 % de los animales resultaron positivos a la técnica de centrifugación del hematocrito (HCT) para *Trypanosoma spp* del total de muestras analizadas, 35 animales presentaban un hematocrito inferior a 24% lo que es considerado como anemia según lo descrito por Radostits et al., (2006). El primer muestreo realizado en la provincia de Orellana con 13 positivos para Woo de 72 muestras recolectadas, sugiere una alta prevalencia de tripanosomosis bovina, sin embargo, esta prueba no evidencia la presencia de *T. vivax* ya que al ser una prueba de diagnóstico directo no permite distinguir la especie de tripanosoma, de hecho, Woo, (1969) señalaba que este método no debe utilizarse para estudios morfológicos detallados. No obstante, es una técnica rápida sencilla y fiable para la detección de parasitemias, especialmente durante el estado agudo de la enfermedad,

Ramirez et al., (2011) comparó diferentes métodos de diagnóstico de tripanosomosis en una infección experimental en conejos y demostró que la prueba parasitológica de microcentrifugación de hematocrito no detecta la presencia del parásito en el periodo de prepatencia (días 3, 5, 7 y 9 post infección) ni tampoco en el periodo crónico de la enfermedad, pero sí es muy efectiva en la detección de parasitemia en el periodo agudo, ya que detectó la presencia del parásito en todas las muestras analizadas de este periodo.

En el segundo muestreo, se encontraron 2 positivos en la prueba de Woo, de los cuales uno solo resultó ser identificado como *T. vivax* por PCR. Estos resultados ponen en evidencia lo señalado anteriormente, donde se describe las potencialidades diagnósticas de la prueba de Woo, pero esta no permite identificar a la especie de Tripanosoma. Un estudio de Guayaquil & Ramírez, (2022) en la parroquia de García Moreno de la provincia de Orellana, confirmaron la presencia de *T. evansi* mediante LAMP y PCR, encontrando una prevalencia de 26.32% entre los dos métodos. Otro estudio muy reciente en zonas cercanas a las analizadas en este estudio, han demostrado la presencia de *T. theileri* mediante técnicas moleculares con una prevalencia del 26.6% (De la Cadena et al., 2023), lo que sugiere que los resultados positivos obtenidos de la prueba parasitológica de Woo en este estudio, se deban a la posible infección con cualquiera de otras especies del hemoparásito (*T. theileri* y/o *T. evansi*) en lugar de *T. vivax*.

Por otra parte, solo 4 muestras de las 15 positivas a Woo presentaban un hematocrito menor a 24%, lo que podría significar que los animales se encuentran en fase crónica, donde el parásito se mantiene haciendo ciclos de parasitemia. Según un estudio de infección experimental con *T. vivax* de Parra-Giménez y Reyna-Bello (2019), los animales tienden a presentar una disminución en los valores de hematocrito y hemoglobina hasta el día 22 postinfección, luego los valores suelen regresar al rango normal. No obstante, también podría

sugerir la presencia de especies con una baja parasistema como *T. theileri*, que suele distinguirse por esta característica (Marc Desquesnes, 2004).

La estandarización de la PCR para la detección específica de *Trypanosoma vivax* mediante el uso de TWJ-F y TWJ-R que amplifican un fragmento 400 pb dirigido al gen que codifica el antígeno específico del hemoparásito, se realizó a partir de gradientes de temperatura de hibridación y gradiente de la concentración de cebadores, que son parámetros importantes en el óptimo desempeño de la PCR según Cha & Thilly (1993), quienes determinaron que estas variables influyen en la especificidad y la sensibilidad de reacción, y Lorenz (2012) resalta la importancia de buen diseño y concentración de cebadores y de la óptima temperatura de hibridación como factores esenciales para el éxito en la amplificación.

Es vital la determinación de una temperatura de hibridación óptima ya que esta se relaciona muy de cerca con la especificidad de la reacción (Kramer & Coen, 2002), generalmente esta temperatura se determina con la ayuda de softwares disponibles que realizan estos cálculos, mediante la ayuda de Tm Calculator de ThermoFisher Scientific, se determinó una Tm de 70°C, la temperatura de hibridación utilizada normalmente es ~8°C por debajo de la Tm (Wages, 2005), por lo que se realizó un gradiente a partir de este valor disminuyendo la temperatura en 2°C y a partir de los resultados obtenidos (Figura 7A) se determinó que la temperatura de 60 °C ya que se observan baja presencia de bandas no específicas, además de una banda clara bien definida, que concuerda con Innis et al., (2012) que menciona que la temperatura de hibridación varía de entre 55 a 72°C. En general, las bajas temperaturas de hibridación aumentan la probabilidad de oligomerización de los cebadores, así como también los productos de PCR no específicos (Wages, 2005).

La correcta determinación de los cebadores en la reacción en cadena de la polimerasa juega un papel fundamental en la amplificación de un determinado fragmento ya que las concentraciones más altas pueden aumentar la hibridación no específica de los cebadores y,

por lo tanto, a productos de amplificación no específicos, en general las concentraciones de cebadores varían entre 0,1 - 1 μM (Wages, 2005). Se realizó un gradiente de concentración de cebadores dentro este rango y se determinó que la concentración de 0,2 μM es la óptima para la reacción debido a que presentó una banda más intensa y sin inespecificidades como se observa en la Figura 7B, lo que coincide con Wages, (2005) e Innis et al. (2012) quienes mencionan que una concentración elevada de cebadores incrementa las inespecificidades en la reacción.

La TWJ-PCR que amplifica un fragmento 400 pb del gen que codifica el antígeno específico de *T. vivax*, se realizó en todas las muestras recolectadas de los diferentes muestreos realizados en la provincia de Orellana, donde se obtuvo la amplificación de fragmento esperado de aproximadamente 400 pb en un total de 4 muestras de ADN genómico, que coinciden con la muestra SaBo-214 confirmada como positiva para *T. vivax* mediante TviCatL (Figura 8), es decir, se encontraron 4 casos positivos a *T. vivax* mediante TWJ-PCR de las 186 muestras analizadas, significando una prevalencia del 2.15%. Los cebadores utilizados en este estudio son altamente sensibles según un estudio de Eleizalde, et al., (2021) donde se obtuvo que fueron capaces de detectar una cantidad mínima de parásitos en sangre (0.001 parásitos por mL).

La baja prevalencia de *T. vivax* en la población analizada, limitó la comprobación de la eficacia del tratamiento en mayor escala, sin embargo, los resultados evidenciaron el poder del medicamento a base de cloruro de isometamidium para el tratamiento y control de la tripanosomosis bovina causada por *T. vivax*, donde a los animales confirmados como positivos al hemoflagelado mediante TWJ-PCR, dos meses después de la aplicación del tratamiento resultaron negativos a *T. vivax* comprobado mediante técnicas moleculares. Esto coincide con estudios anteriores donde se informó que el tratamiento con cloruro de isometamidio fue eficaz a una dosis de 0,5 mg/kg, sin encontrar parásitos circulantes en la sangre hasta 113 días

después del tratamiento (Schonefeld et al. 1987), y 12 semanas en el estudio de Peregrine, et al. (1987). Otros estudios reportaron que los protocolos de tratamiento con isometamidium (0,5y 1,0 mg/kg) lograron una eficacia terapéutica del 100 % contra *Trypanosoma vivax* en bovinos infectados experimentalmente (Bastos, et al., 2020) y en otros estudios de infecciones experimentales se utilizó el cloruro de isometamidium a los 36 días posteriores a la infección para prevenir la muerte del animal (Parra-Gimenez y Reyna-Bello, 2019).

A pesar de su efectividad, es importante tener un control en la aplicación y uso del medicamento, ya que se han reportado aislados africanos resistentes al cloruro de isometamidium debido a su uso indiscriminado (Giordani et al., 2016). Otro estudio donde se indujo a dosis progresivas de cloruro de isometamidium a roedores, se evidenció que los parásitos adquirieron resistencia completa después de cinco meses y que retuvieron este fenotipo totalmente resistente después de un período de seis meses sin presión de drogas (Tihon, et al. 2017). En otro estudio reciente de Castilho Neto et al. (2021) evidenciaron por primera vez la persistencia de la infección por *T. vivax* en un rebaño infectado naturalmente, incluso bajo el tratamiento con cloruro de isometamidium, lo que indicaría que existen cepas de *T. vivax* resistentes a la quimioterapia de cloruro de isometamidium en Brasil.

En Ecuador no se encuentra aprobado su uso por la agencia de regulación y control fitosanitario (Agrocalidad) según el Registro de Insumos Pecuarios, solamente se incluye el diminaceno. Mediante el presente estudio, se pudo comprobar la eficacia del tratamiento a base de cloruro de isometamidium para el control de la tripanosomosis bovina ocasionada por el hemoparásito *T. vivax*, lo que sugiere que se podría incluir su uso dentro de este registro, para el manejo de la enfermedad en el territorio ecuatoriano y evitar así pérdidas económicas en el sector ganadero, el cual es uno de los más importantes de la producción nacional.

El análisis estadístico permitió determinar que la variable de temperatura está estrechamente relacionado a la infección por *T. vivax*, debido a que es estadísticamente

significativa la diferencia de los valores de temperatura antes y después del tratamiento en aquellos animales positivos, mientras que el hematocrito no pareciera estar estrechamente relacionado el hecho de estar enfermo o no. Estos resultados se pueden asociar a que el parásito se aloja en el torrente sanguíneo y el sistema inmunitario del huésped empieza el mecanismo de defensa aumentando la temperatura, para lograr controlar la infección, por lo que, una vez esta ha alcanzado el periodo crónico de la enfermedad el parásito se mantiene críptico dentro del huésped y los valores del hematocrito vuelven a un rango normal dentro de este periodo.

Capítulo VI: Conclusiones

El medicamento en base a cloruro de isometamidium, mostró eficacia para eliminar *T. vivax* del torrente circulatorio de aquellos animales que resultaron ser TWJ-PCR positivos y de igual manera, su aplicación en la zona eliminó nuevas incidencias del parásito.

La prueba de diagnóstico parasitológico directo de Woo determinó la presencia de tripanosomosis bovina en muestras sanguíneas de animales provenientes de la provincia de Orellana, donde se encontró un total de 15 muestras positivas a *Trypanosoma spp*, sin embargo, solo una de estas se pudo identificar como *T. vivax*, además de esta, en el segundo muestreo, se logró identificar 3 animales más TWJ-PCR positivos. En total se encontraron 4 casos positivos confirmados mediante TWJ-PCR de una población de 186 muestras examinadas (2.15%). En esta población, el uso un tratamiento a base de cloruro de isometamidium fue efectivo para el control de la tripanosomosis bovina causada por *T. vivax*, ya que dos meses después de su aplicación los animales resultaron negativos a TWJ-PCR y ningún otro bovino de la zona resultó ser positivo al parásito, evitando la transmisión de un animal a otro.

El mejor método para la extracción de ADN genómico a partir de muestras sanguíneas de bovino fue mediante GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific), ya que las muestras de ADN genómico presentaron menor degradación, además la intensidad de los ADN en los geles de agarosa fue mayor, lo que sugiere más concentración del material genético. Mediante el protocolo modificado de Riera et al., (2010) también se logró extraer ADN a partir de células sanguíneas, pero con la particularidad que se presentaban bandas con degradación y contaminación, por lo que se podría incluir un proceso de desalinización adicional, o purificación para eliminar las impurezas presentes en el ADN resultante.

Para la estandarización de la PCR se variaron los parámetros de temperatura de hibridación y la concentración de cebadores ya que son variables determinantes a la hora de la

amplificación en la reacción, los valores en este estudio se ajustaron 60 °C para la temperatura de hibridación y 0,2 µM de concentración de los primers, que resultó en la amplificación de una banda esperada de 400 pb sin presencia de bandas no específicas, por lo que se concluye que estos valores son los más favorables para la TWJ-PCR.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda realizar este estudio en una población con una mayor prevalencia de *T. vivax*, para contrastar la eficiencia del tratamiento frente al hemoparásito, además se recomienda el uso del medicamento de nombre comercial “Hemoveex” que tiene la capacidad de contrarrestar la enfermedad y ayuda con el control de endo y exo parásitos por su formulación con ivermectina.

Se recomienda el uso del tratamiento a base de cloruro de isometamidium para el tratamiento de la tripanosomosis bovina ocasionada por *T. vivax*.

Se recomienda la extracción de ADN mediante GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) para obtener una mejor calidad y cantidad de ADN, ya que mediante este protocolo se visualizaron bandas más intensas y sin inespecificidades.

Se recomienda añadir pasos de desalinización al protocolo modificado de Riera, et al., (2010) para obtener una mejor calidad y cantidad de ADN extraído, ya que los resultados indican que existe una presencia de impurezas y poca concentración del material genético.

Para cuantificar con exactitud la cantidad y la pureza del material genético se recomienda el uso de métodos específicos como espectrofotometría o fluorometría.

Capítulo VIII: Bibliografía

Abbas A, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. Cellular and Molecular Immunology. 9th Ed. Amsterdam: Elsevier (2018). p. 57–97.

Agrocalidad. (2022). [Productos Agropecuarios Registrados] Reporte de Productos de uso Veterinario Registrados. Página web de Agrocalidad (Subsitio Coordinación de Registro de Insumos Agropecuarios), Prod_veterinarios_registrados_octubre_2022, Quito, Ecuador.

Alfituri, O. A., Quintana, J. F., MacLeod, A., Garside, P., Benson, R. A., Brewer, J. M., Capewell, P. (2020). To the Skin and Beyond: The Immune Response to African Trypanosomes as They Enter and Exit the Vertebrate Host. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.01250

Authié, E., & Pobel, T. (1990). Serum haemolytic complement activity and C3 levels in bovine trypanosomosis under natural conditions of challenge—early indications of individual susceptibility to disease. *Veterinary Parasitology*, 35(1-2), 43-59.

Bakari SM, Ofori JA, Kusi KA, Aning GK, Awandare GA, Carrington M, et al. Serum biochemical parameters and cytokine profiles associated with natural African trypanosome infections in cattle. *Parasites Vectors*. (2017) 10:312. doi: 10.1186/s13071-017-2255-9

Baral TN. Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. *J Biomed Biotechnol*. (2010) 2010:389153. doi: 10.1155/2010/389153

Bastos, T. S. A., Faria, A. M., de Assis Cavalcante, A. S., de Carvalho Madrid, D. M., Zapa, D. M. B., Nicaretta, J. E., Cruvinel, L. B., Heller, L. M., Couto, L. F. M., Soares, V. E., Cadioli, F. A., & Lopes, W. D. Z. (2020). Comparison of therapeutic efficacy of different drugs against *Trypanosoma vivax* on experimentally infected cattle. *Preventive veterinary medicine*, 181, 105040. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105040>

Castilho Neto KJGA, Garcia ABCF, Fidelis Junior OL, Nagata WB, André MR, Teixeira MMG, et al. Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Braz J Vet Parasitol* 2021; 30(1): e020220.

<https://doi.org/10.1590/S1984-29612021019>

Cha, R. S., & Thilly, W. G. (1993). Specificity, efficiency, and fidelity of PCR. *PCR methods and applications*, 3(3), S18–S29. <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.s18>

Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R., Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., ... & Reyna-Bello, A. (2021). First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 2422-2428.

Chitanga, S., Marcotty, T., Namangala, B., Van Den Bossche, P., Van Den Abbeele, J., & Delespaux, V. (2011). High Prevalence of Drug Resistance in Animal Trypanosomes without a History of Drug Exposure. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(12), e1454.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001454>

Coello-Peralta, R. D., Solórzano, N. C. C., Mazamba, M. D. L. S., Echeverria, E. O. R., Velásquez, L. L. A., & Gómez, B. J. P. (2022). Natural infection of *Trypanosoma* sp. in domestic sheep from Ecuador. *Ciência Rural*, 52(2). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20210141>

Dagnachew, S., & Bezie, M. (2015). Review on *Trypanosoma vivax*. *Afr J Basic ApplSci*, 7(1), 41-64.

Dávila, A. M. R., Herrera, H. M., Schlebinger, T., Souza, S. S., & Traub-Cseko, Y. M. (2003). Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Veterinary parasitology*, 117(1-2), 1-13.

Desquesnes, M. (2004). Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America (Vol. 8). Paris: OMSA.

Desquesnes, M., & Dia, M. L. (2003). Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Experimental Parasitology*, 105(3-4), 226-231.

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). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x>

Gardiner, P. R. (1989). Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*, 28, 229-317.

Gardiner, P. R. and Mahmoud, M. M. (1992). Salivarian trypanosomes causing disease in livestock outside sub-saharan Africa. In *Parasitic Protozoa* (ed. Kreier, J. P. and Baker, J. R.), pp. 277–313. Academic Press, London. CrossRef

Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, De Koning HP, Barrett MP. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology* 2016; 143(14): 1862-1889. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182016001268>. PMID:27719692.

Giordani, F., Morrison, L. J., Rowan, T. G., DE Koning, H. P., & Barrett, M. P. (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 143(14), 1862–1889. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001268>

Giordani, F., Morrison, L. J., Rowan, T. G., De Koning, H. P., & Barrett, M. P. (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 143(14), 1862- 1889.

Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2013).

Trypanosoma (Duttonella) vivax and Trypanosomosis in Latin America:

Secadera/Huequera/Cacho Hueco. Trypanosomes and Trypanosomiasis, 261-285.

https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11

Guayaquil, G. & Ramírez, J.R. (2022). Implementación de la técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de trypanosoma spp. en animales de interés pecuario en la provincia de Orellana [Tesis de pregrado, Universidad Internacional SEK Ecuador]. Repositorio de la Universidad Internacional SEK Ecuador

<http://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/4556>

Hoare, C. A. (1972). The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.

Innis, MA, Gelfand, D., Sninsky, J., & White, T. (2012). PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press.

<https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=Z5jwZ2rbVe8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=PCR+Protocols:+A+guide+to+methods+and+applications.&ots=IBKYli0O9v&sig=VEjMgk2asWiWGF6nfnLJwdU9pcE>

Jones, T. W., & Dávila, A. M. (2001). *Trypanosoma vivax*—out of Africa. *TRENDS in Parasitology*, 17(2), 99-101.

Kasozi, K. I., MacLeod, E. T., Ntulume, I., & Welburn, S. C. (2022). An Update on African Trypanocide Pharmaceuticals and Resistance. *Frontiers in veterinary science*, 9, 828111.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.828111>

Kinabo L. D. (1993). Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. *Acta tropica*, 54(3-4), 169–183. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(93\)90091-o](https://doi.org/10.1016/0001-706x(93)90091-o)

Kramer, M. F., & Coen, D. M. (2002). The polymerase chain reaction. *Current Protocols in Protein Science*, 29(1), A-4J. <https://doi.org/10.1002/0471140864.PSA04JS29>

Lainson, R., & Shaw, J. J. (1972). Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems.

Leger, M., & Vienne, M. (1919). An Epizootic caused by Trypanosomes in Cattle in French Guiana. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 12(5).

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., ... & Wallace, F. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa* The committee on systematics evolution of the society of protozoologists. *The Journal of protozoology*, 27(1), 37-58.

Lorenz T. C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (63), e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>

Mabbott NA, Sutherland IA, Sternberg JM. Trypanosoma brucei is protected from the cytostatic effects of nitric oxide under in vivo conditions. *Parasitol Res.* (1994) 80:687–90.

Macaskill, J. A., Holmes, P. H., Whitelaw, D. D., McConnell, I., Jennings, F. W., & Urquhart, G. M. (1980). Immunological clearance of ⁷⁵Se-labelled Trypanosoma brucei in mice. II. Mechanisms in immune animals. *Immunology*, 40(4), 629.

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. *Revista Científica*, 27(3), 162-171.

National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 92295, Isometamidium chloride. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isometamidium-chloride>

OMSA, O. M. (2017). OMSA Reference Laboratory for Animal Trypanosomoses of African origin. Obtenido de: https://www.woah.org/nttat/Attached%20files/A16-REC-COMPENDIUM_PROTOCOLES_TRYPANO-En.pdf

OMSA, O. M. (2021). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2022. Obtenido de: https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.14_NAGANA.pdf

Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Costa, S. C. G. D. (2008). *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World—a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 1-13.

Parra-Gimenez, N., & Reyna-Bello, A. (2019). Parasitological, Hematological, and Immunological Response of Experimentally Infected Sheep with Venezuelan Isolates of *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Trypanosoma vivax*. *Journal of Parasitology Research*, 2019, 1–9. doi:10.1155/2019/8528430

PEREGRINE, A. S., MOLOO, S. K., & WHITELAW, D. D. (1987). Therapeutic and prophylactic activity of isometamidium chloride in Boran cattle against *Trypanosoma vivax* transmitted by *Glossina morsitans centralis*. *Research in Veterinary Science*, 43(2), 268–270. doi:10.1016/s0034-5288(18)30787-2

Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., & Constable, P. (2006). *VETERINARY MEDICINE A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses* (10th ed.). Elsevier.

- Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Gómez-Piñeres, E., & Mendoza, M. (2011). *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Experimental Parasitology*, 128(1), 91–96.
doi:10.1016/j.exppara.2011.02.010
- Reyna-Bello, A., García, F. A., Rivera, M., Sansó, B., & Aso, P. M. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Veterinary Parasitology*, 80(2), 149-157.
- Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (14), 4–7.
- Rivera, M. (1996). Hemoparasitosis bovinas. Editado por Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. Caracas:237.
- Robin, J. D., Ludlow, A. T., LaRanger, R., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2016). Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing. *Scientificreports*, 6, 24067. <https://doi.org/10.1038/srep24067>
- Shiferaw, S., Muktar*, Y., & Belina, D. (2015). A review on trypanocidal drug resistance in Ethiopia. *Journal of Parasitology and Vector Biology*, 7(4), 58-66.
<https://doi.org/10.5897/JPVB2015.0190>
- Soulsby, E. J. L. (1987). The evasion of the immune response and immunological unresponsiveness: parasitic helminth infections. *Immunology Letters*, 16(3-4), 315-320.
- Sutcliffe, O. B., Skellern, G. G., Araya, F., Cannavan, A., Sasanya, J. J., Dungu, B., van Gool, F., Münstermann, S., & Mattioli, R. C. (2014). Animal trypanosomosis: making quality control of trypanocidal drugs possible. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 33(3), 813–830. <https://doi.org/10.20506/rst.33.3.2320>

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2009, 574398.

<https://doi.org/10.1155/2009/574398>

Tapia, J. (1995). Medidas de prevalencia y relación incidencia-prevalencia. *Medicina clínica*.

Tihon, E., Imamura, H., Van den Broeck, F., Vermeiren, L., Dujardin, J. C., & Van Den Abbeele, J. (2017). Genomic analysis of Isometamidium Chloride resistance in *Trypanosoma congolense*. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance*, 7(3), 350–361.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2017.10.002>

Urquhart, G. M., & Holmes, P. H. (1987). African trypanosomiasis. Immune responses in parasitic infections: immunology, immunopathology, and immunoprophylaxis. Volume III: Protozoa, 1-23.

Ventura, R. M., Paiva, F., Silva, R. A., Takeda, G. F., Buck, G. A., & Teixeira, M. M. (2001). *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Experimental Parasitology*, 99(1), 37-48.

Venturelli, A., Tagliazucchi, L., Lima, C., Venuti, F., Malpezzi, G., Magoulas, G. E., Santarem, N., Calogeropoulou, T., Cordeiro-da-Silva, A., & Costi, M. P. (2022). Current Treatments to Control African Trypanosomiasis and One Health Perspective. *Microorganisms*, 10(7), 1298. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071298>

Wages J. M., Jr. (2005). POLYMERASE CHAIN REACTION. *Encyclopedia of Analytical Science*, 243–250. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00475-1>

Wells, E., Betancourth, A., & Ramirez, L. (1977). The epidemiology of *Trypanosoma vivax* in Latin America: some results from the use of an indirect fluorescent antibody test. *Journal of Protozoology*, 24, 41A-2A.

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