



**Determinación de la presencia de una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos experimentalmente infectados y posteriormente tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium mediante la prueba molecular TviCatL-PCR**

Changoluisa Alvear, Alisson Denisse

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Chávez Larrea María Augusta M.Sc.

14 de febrero del 2023



# Informe de originalidad

---

## NOMBRE DEL CURSO

Revision Tesis OCT 2022 A MARZO 2023

## NOMBRE DEL ALUMNO

ALISSON DENISSE CHANGOLUISA ALVEAR

## NOMBRE DEL ARCHIVO

ALISSON DENISSE CHANGOLUISA ALVEAR - Documento sin título

## CREACIÓN DEL INFORME

14 feb 2023

---

## Resumen

Pasajes marcados	2	0.3 %
Pasajes citados/entrecomillados	0	0 %

## Coincidencias en la Web

passeidireto.com	1	0.2 %
woah.org	1	0.1 %

---

1 de 2 pasajes

Pasaje del alumno MARCADO

...**El género Trypanosoma pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae.** Este género se divide en dos secciones: estercoraria...

## Coincidencia principal en la Web

**El género Trypanosoma pertenece a la rama de los protozoos del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae.**

trypanosoma evansi y t.

equiperdum [https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.14\\_NAGANA.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.14_NAGANA.pdf)

---

2 de 2 pasajes

Pasaje del alumno MARCADO

...en un termobloque con agitación (Thermo Scientific, USA). Luego, **se añadió 200 µL de etanol absoluto y se mezcló por inversión.**

## Coincidencia principal en la Web

Se recuperaron las fases acuosas en un tubo nuevo de 1.5 mL, **se añadió 900 µL de etanol absoluto, se mezcló por inversión** hasta que el DNA precipitó, ...



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

### **Certificación**

Certifico que el trabajo de titulación: **“Determinación de la presencia de una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos experimentalmente infectados y posteriormente tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium mediante la prueba molecular TviCatL-PCR”** fue realizado por la señorita **Changoluisa Alvear, Alisson Denisse**; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 14 de febrero del 2023



Firmado electrónicamente por:  
**MARIA AUGUSTA  
CHAVEZ LARREA**

**Chávez Larrea, María Augusta M.Sc.**

C. C.: 0201274842



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **Changoluisa Alvear, Alisson Denisse**, con cédula de ciudadanía n° **1753514627** declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Determinación de la presencia de una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos experimentalmente infectados y posteriormente tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium mediante la prueba molecular TviCatL-PCR”** 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.

Sangolquí, 14 de febrero del 2023

*Alisson Changoluisa*.....

**Changoluisa Alvear, Alisson Denisse**

C. C.: 1753514627



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**  
**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de publicación**

Yo, **Changoluisa Alvear, Alisson Denisse**, con cédula de ciudadanía n° **1753514627** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Determinación de la presencia de una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos experimentalmente infectados y posteriormente tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium mediante la prueba molecular TviCatL-PCR”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 14 de febrero del 2023

.....*Alisson Changoluisa*.....

**Changoluisa Alvear, Alisson Denisse**

C. C. 1753514627

## Dedicatoria

A mis padres, Pilar y Byron, quienes con su esfuerzo y sacrificio han hecho todo lo posible para que yo pueda culminar esta etapa de mis estudios. Infinitas gracias a ellos que me han brindado su amor, consejos y apoyo incondicional, no lo hubiera logrado sin ustedes.

Alisson Denisse Changoluisa Alvear

## Agradecimientos

Agradezco a mis padres por haberme permitido desarrollar mis estudios universitarios y por ser mi guía en cada etapa del camino, han sido piezas fundamentales para alcanzar esta meta. Que felicidad me da decirles: ¡Lo logramos!

A toda mi familia por apoyarme en cada circunstancia y por enseñarme a seguir siempre adelante, especialmente a mi mami Pilar, gracias por todo lo que has sacrificado para que yo pueda llegar lejos, por estar pendiente de mí en cada noche de estudio, por ser mi consuelo cuando las cosas no salían bien, y por cada palabra de aliento. No encuentro palabras para agradecerte por todo lo que has hecho por mí.

A mis amigos, Dani, Antho y Jeri que estuvieron conmigo desde el primer día en la Universidad, gracias por todos los momentos que compartimos, los recuerdo siempre con mucho cariño; a los que conocí a lo largo de la carrera, Raque, Stefy, Mishell, Chris, Helen, Cami y Shell, su amistad representa mucho para mí, gracias por ser el ejemplo de que se puede estudiar y disfrutar a la vez, por su apoyo, por hacer de mi etapa universitaria una de las mejores experiencias, estoy segura que nuestra amistad no termina aquí.

A la Ing. Cristina Cholota, a la Ing. Michelle Yugcha y al Ing. Fausto Bedoya con quienes pasé gratos momentos durante mi estancia en el laboratorio, gracias por su paciencia, por su apoyo, por sus consejos y por compartir sus conocimientos conmigo.

A la Academia de Investigación y Enseñanza Superior (ARES) y la Universidad de Lieja, Bélgica por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación dentro del marco de actividades del proyecto BryTryp, por su apoyo y financiamiento.

A la Dra. María Augusta Chávez, al Dr. Jorge Ron y al Dr. Armando Reyna por su ayuda a lo largo de esta investigación, por sus enseñanzas y por su guía durante la realización del proyecto.

Gracias a todos los chicos del IASA por hacer que cada momento que pasamos durante este trabajo sea memorable, gracias por su ayuda en cada problema que se presentó, por estar pendientes de cada detalle. Esta etapa no hubiera sido lo mismo sin ustedes.

Por último, gracias a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y a los docentes de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, que me dieron los conocimientos para que yo pueda formarme como una gran profesional.

## Índice de Contenido

Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria .....	6
Agradecimientos.....	7
Listado de abreviaturas.....	14
Resumen.....	16
Abstract .....	17
Capítulo I: Introducción .....	18
Formulación del problema.....	18
Justificación del problema .....	18
Objetivos de la investigación .....	20
<i>Objetivo general</i> .....	20
<i>Objetivos específicos</i> .....	20
Hipótesis .....	21
Capítulo II: Marco referencial .....	22
Tripanosomosis causada por <i>Trypanosoma vivax</i> .....	22
<i>Morfología de Trypanosoma vivax</i> .....	23
<i>Transmisión</i> .....	24

	10
<i>Patogenia y sintomatología</i> .....	25
<i>Diagnóstico molecular</i> .....	25
<i>Tratamiento</i> .....	26
Capítulo III: Metodología .....	29
Revisión Bibliográfica .....	29
Unidades de Estudio .....	29
Recolección de Muestras Sanguíneas .....	31
Extracción de ADN a partir de sangre total .....	32
Diagnóstico molecular .....	33
<i>PCR convencional para diagnóstico de Babesia spp.</i> .....	33
<i>PCR convencional para el diagnóstico de A. marginale</i> .....	34
<i>PCR convencional para el diagnóstico de T. theileri</i> .....	35
<i>PCR convencional para el diagnóstico de T. evansi</i> .....	36
<i>PCR convencional para el diagnóstico de T. vivax</i> .....	37
<i>Visualización de los productos de PCR</i> .....	38
Capítulo IV: Resultados .....	39
Verificación de la ausencia de <i>T. vivax</i> previo a la infección experimental .....	39
Trazabilidad de la infección experimental con <i>T. vivax</i> .....	39
Efectividad del tratamiento con dipropionato de imidocarb (Imidopar®) en los bovinos infectados con una cepa nativa de <i>T. vivax</i> .....	42

Efectividad del tratamiento con diaceturato de diminazeno (Berenil®) en los bovinos infectados experimentalmente con una cepa nativa de <i>T. vivax</i> .....	44
Efectividad de los tratamientos con cloruro de isometamidium (Hemoveex®) en los bovinos infectados experimentalmente con una cepa nativa de <i>T. vivax</i> .....	46
Capítulo V: Discusión .....	49
Capítulo VI: Conclusiones.....	53
Capítulo VII: Recomendaciones .....	54
Bibliografía.....	55

**Índice de tablas**

<b>Tabla 1</b> <i>Clasificación taxonómica de Trypanosoma vivax viennei Lavier, 1921</i> .....	23
<b>Tabla 2</b> <i>Medicamentos para el tratamiento de los bovinos durante la infección experimental</i> .....	31
<b>Tabla 3</b> <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Babesia spp.</i> .....	34
<b>Tabla 4</b> <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Anaplasma marginale</i> .....	35
<b>Tabla 5</b> <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Trypanosoma theileri</i> .....	36
<b>Tabla 6</b> <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Trypanosoma evansi</i> .....	37
<b>Tabla 7</b> <i>Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Trypanosoma vivax</i> .....	38

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> Organización de las unidades de estudio .....	30
<b>Figura 2</b> Curso de la infección experimental con <i>T. vivax</i> mediante gota fresca, TviCatL-PCR y prueba de Woo en el bovino donante .....	40
<b>Figura 3</b> Resultados de la prueba TviCatL PCR del día 32 post infección de los bovinos de la infección experimental y día 39 post infección del bovino donante .....	41
<b>Figura 4</b> Curso de la infección experimental con <i>T. vivax</i> mediante TviCatL-PCR en el bovino control positivo .....	42
<b>Figura 5</b> Curso de la infección experimental con <i>T. vivax</i> mediante TviCatL-PCR en los tres bovinos del grupo de tratamiento con 4.8 mg/kg de peso con dipropionato de imidocarb .....	43
<b>Figura 6</b> Curso de la infección experimental con <i>T. vivax</i> mediante TviCatL-PCR en los tres bovinos del grupo de tratamiento con 7 mg/kg de peso de diaceturato de diminazeno .....	45
<b>Figura 7</b> Curso de la infección experimental con <i>T. vivax</i> mediante TviCatL-PCR en los bovinos del grupo de tratamiento con 1 mg/kg de peso con cloruro de isometamidium .....	46

**Listado de abreviaturas**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>DIM</b>	Diaceturato de diminazeno
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>g</b>	gramos
<b>IMI</b>	Dipropionato de imidocarb
<b>ISO</b>	Cloruro de Isometamidium
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>mA</b>	Miliamperios
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mg</b>	Miligramo
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>TviCatL PCR</b>	PCR para la amplificación de catepsina tipo L
<b>μL</b>	Microlitros

**μM**      Micro molar

**UV**      Ultravioleta

**V**      Voltios

## Resumen

*Trypanosoma vivax* es un hemoparásito patógeno que se transmite mecánicamente por moscas hematófagas causando pérdidas económicas importantes en la industria ganadera, la sintomatología de la enfermedad consiste en anemia, desórdenes nerviosos, pérdida de peso e incluso la muerte. Actualmente en Ecuador no existe un tratamiento recomendado para la enfermedad. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de una cepa nativa de *T. vivax* en bovinos experimentalmente infectados y posteriormente tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium mediante la prueba molecular TviCatL-PCR. Esta investigación estuvo conformada por tres grupos experimentales con tres bovinos cada uno, además se contó un bovino donante, un bovino control positivo, un bovino control negativo dentro del corral y tres bovinos controles negativos fuera del corral. Los animales fueron infectados con  $1 \times 10^6$  tripanosomas y luego del primer pico de parasitemia fueron tratados con una dosis de 4.8 mg/kg de peso de dipropionato de imidocarb, dos dosis de 7 mg/kg de peso de diaceturato de diminazeno en y una dosis de 1 mg/kg de peso de cloruro de isometamidium. Mediante el uso de TviCatL PCR se pudo evidenciar ADN de *T. vivax* desde el día 4 hasta el día 42 post infección en el bovino donante y en el bovino control positivo. Un bovino del grupo de tratamiento con dipropionato de imidocarb presentó ADN de *T. vivax* luego de ser aplicado el fármaco, los otros dos bovinos murieron antes de ser tratados; los bovinos pertenecientes a los grupos de tratamiento con diaceturato de diminazeno y cloruro de isometamidium no presentaron ADN del parásito luego de ser tratados.

*Palabras clave:* *Trypanosoma vivax*, isometamidium, imidocarb, diminazeno, infección experimental

### Abstract

*Trypanosoma vivax* is a pathogenic hemoparasite that is transmitted mechanically by blood-sucking flies that causes important economic losses in the livestock industry, the symptoms of the disease consist of anemia, nervous disorders, weight loss and even death. Currently in Ecuador there is no recommended treatment for the disease. The objective of this study was to determine the presence of a native strain of *T. vivax* in bovines experimentally developed and later treated with diminazene diaceturate, imidocarb dipropionate and isometamidium chloride using the TviCatL-PCR molecular test. This investigation consisted of three experimental groups with three bovines each, in addition there was a donor bovine, a positive control bovine, a negative control bovine inside the pen and three negative control bovines outside the pen. The animals were obtained with  $1 \times 10^6$  trypanosomes and after the first parasitaemia peak they were treated with a dose of 4.8 mg/kg of imidocarb dipropionate, two doses of 7 mg/kg of diminazene diaceturate in and a dose of 1 mg/kg of weight of isometamidium chloride. Through the use of TviCatL PCR, it was possible to demonstrate *T. vivax* DNA from day 4 to day 42 post infection in the donor bovine and in the positive control bovine. One bovine in the imidocarb dipropionate treatment group presented *T. vivax* DNA after the drug was applied, the other two bovines died before being treated; the cattle belonging to the treatment groups with diminazene diaceturate and isometamidium chloride did not appear parasite DNA after being treated.

*Keywords:* *Trypanosoma vivax*, isometamidium, imidocarb, diminazene, experimental infection

## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

Según Leger & Vienne (1919) citado por (Magez & Radwanska, 2014), *Trypanosoma vivax* fue introducido en la Guyana Francesa y las Antillas en el año de 1830 mediante el ganado de origen senegalés luego se extendió a diferentes países de América Latina incluidos Brasil, Colombia, Guadalupe, Guyana, Martinica, Panamá, Surinam, Venezuela, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Paraguay y Perú (Desquesnes, 2004; Godfrey, 1987; Jones & Dávila, 2001).

En un estudio realizado por Cortez et al., (2009) se estableció un ensayo de PCR basándose en la secuencia CatL-like específica de *T. vivax* (TviCatL-PCR), esta prueba ha demostrado ser específica, altamente sensible y adecuada para su uso con ADN de muestras sanguíneas recolectadas en campo y almacenadas a temperatura ambiente, siendo una herramienta útil para estudios epidemiológicos de *T. vivax* ya que permite detectar poblaciones de África Occidental y Oriental y América del Sur (Cortez et al., 2009).

En el 2017 la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – Ecuador (AGROCALIDAD) informó acerca de un brote de tripanosomosis bovina en el Cantón Chone en la Provincia de Manabí. Debido a esto, en el 2018 se realizó una visita a tres fincas de la zona, con el uso de TviCatL-PCR, se analizaron veinte muestras sanguíneas de ganado de las fincas, de las cuales tres fueron positivas para *T. vivax*, la secuenciación permitió la confirmación y el reporte de *Trypanosoma (Duttonella) vivax* en el país (Chávez-Larrea et al., 2021).

### Justificación del problema

En el Ecuador, la ganadería es una de las actividades más predominantes del sector pecuario con un total de 4.66 millones de bovinos distribuidos a nivel nacional, encontrándose un 51.91 % en la Región Sierra, 39.13 % en la Región Costa, y 8.96 % en la Región Amazónica. La provincia de Manabí se

encuentra en la Costa y contiene el 21.2 % del ganado total del país, concentrando el mayor porcentaje de ganado del Ecuador (INEC, 2022).

La tripanosomosis animal incluye un conjunto de enfermedades debilitantes causadas por parásitos del género *Trypanosoma* que afectan a mamíferos domésticos y salvajes en países de África, Asia y Latinoamérica (Bengaly et al., 2002; Gonzatti et al., 2014). El ganado bovino es susceptible a la infección por *T. vivax* lo que conduce a formas agudas y crónicas de la enfermedad. En ausencia de tratamiento, esta enfermedad es una causa importante de pérdidas económicas relacionadas con la morbilidad, mortalidad, problemas reproductivos y disminución de la producción en la industria ganadera (Vieira et al., 2017).

En América del Sur, los efectos negativos de la enfermedad han ido en aumento debido diferentes factores como el transporte de animales sin restricción, la rápida propagación de *T. vivax*, la adaptación a nuevas especies de mamíferos hospedadores junto a nuevos modos de transmisión, siendo motivos de preocupación en los sistemas de producción bovina (Giordani et al., 2016; Magez & Radwanska, 2014).

En Ecuador, no se han encontrado reportes de un protocolo de tratamiento regulado para la tripanosomosis. Además, en el país no se dispone del fármaco cloruro de isometamidium que es utilizado en países vecinos como tratamiento de elección para bovinos (Bastos et al., 2020; Betancourt et al., 2020; Kayo et al., 2021). En Brasil, pese a que el fármaco cloruro de isometamidium ha sido aprobado no se encuentra disponible en el país y se lo debe importar con aprobación del ente regulatorio, este trámite lleva de dos a tres meses lo cual es un problema para los ganaderos (Bastos et al., 2017).

El ensayo de PCR y el desarrollo de cebadores sensibles y específicos para cada especie constituyen un avance importante en la identificación de muchos patógenos, incluyendo *T. vivax* (Magez

& Radwanska, 2014). La amplificación de un fragmento del gen de las catepsinas L (CatL-like) permite un diagnóstico altamente sensible y específico para *T. vivax* (Cortez et al., 2009), lo cual no ocurre con los métodos de detección clásicos como la prueba de Woo y el examen de frotis sanguíneo, que son fáciles y baratos de realizar pero poseen baja sensibilidad (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2021).

En el país no existen estudios en los que se haya evaluado la efectividad de tratamientos farmacológicos utilizando bovinos experimentalmente infectados con *T. vivax*. Por consiguiente, el presente trabajo se enfoca en el seguimiento molecular de los animales infectados experimentalmente mediante el uso de la prueba diagnóstica PCR para determinar la presencia del patógeno a lo largo del ensayo y de esta manera poder contribuir al desarrollo de un protocolo para el tratamiento adecuado de la tripanosomosis bovina en el Ecuador.

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo general***

Determinar la presencia de una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos experimentalmente infectados y posteriormente tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium mediante la prueba molecular TviCatL-PCR.

### ***Objetivos específicos***

- Verificar la ausencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos previo a la infección experimental mediante TviCatL-PCR.
- Evaluar la trazabilidad de la infección experimental con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos mediante TviCatL-PCR.
- Determinar el efecto del tratamiento con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium sobre el tiempo de eliminación de una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos experimentalmente infectados mediante TviCatL-PCR.

**Hipótesis**

La prueba molecular TviCatL-PCR permite determinar la presencia de una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* en bovinos experimentalmente infectados y posteriormente tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium.

## Capítulo II: Marco referencial

### **Tripanosomosis causada por *Trypanosoma vivax***

La tripanosomosis es una enfermedad producida por un protozoario del género *Trypanosoma* (Terán & Sota, 1997). Los tripanosomas generan enfermedades en diferentes hospedadores mamíferos incluyendo a los humanos y se encuentran ampliamente distribuidos en África, Asia, América Latina y el Caribe (Cecchi et al., 2014). La tripanosomosis bovina en América del Sur es causada por *T. vivax*, *Trypanosoma evansi*, y *Trypanosoma theileri* que no suele ser patógeno (Cueva, 2021; Terán & Sota, 1997)

Se ha encontrado que *T. vivax* es la especie más patógena en ganado bovino, siendo la combinación de alteraciones microcirculatorias, daños cardíacos, anemia y cuadros nerviosos, las complicaciones que pueden llevar a la muerte de sus hospedadores (Zapata & Reyes, 2011). Estas condiciones de salud dan lugar a disminución en la producción de leche, pérdida de peso, abortos y mala condición del semen (Gonzatti et al., 2014; Zapata & Reyes, 2011). Por estas razones se considera que *T. vivax* es una causa importante de pérdidas económicas relacionadas con la morbilidad, mortalidad, problemas reproductivos y por ende reducción de la producción ganadera (Fetene et al., 2021)

### **Taxonomía de *T. vivax***

El género *Trypanosoma* pertenece al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Este género se divide en dos secciones: estercoraria y salivaria (Stevens & Gibson, 1999). Dentro de los tripanosomas salivarios, los cuales se caracterizan porque su desarrollo ocurre en la parte anterior del sistema digestivo de su vector y su transmisión al huésped ocurre principalmente a través de la saliva infectada de insectos hematófagos, se encuentra el subgénero *Dutonella* del cual forma parte la especie *T. vivax* (Kaufer et al., 2017; Organización Mundial de Sanidad Animal, 2021). Por otra parte los tripanosomas estercorarios aplican su desarrollo cíclico en la parte posterior del tracto digestivo del

vector, como es el caso de *T. theileri*, un tripanosoma transmitido por tábanos y considerado no patógeno (Desquesnes et al., 2022; Organización Mundial de Sanidad Animal, 2021). En la Tabla 1 se detalla la clasificación taxonómica de *Trypanosoma vivax viennei* Lavier, 1921 de acuerdo a Desquesnes, (2004).

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de Trypanosoma vivax viennei Lavier, 1921*

<b>Taxonomía</b>	
Reino	Animalia
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Duttonela</i>
Especie	<b><i>Trypanosoma Duttonela vivax</i></b>

### ***Morfología de Trypanosoma vivax***

*T. vivax* consta de un flagelo libre y terminal que se adhiere al parásito mediante una membrana ondulante de desarrollo medio, el extremo posterior del cuerpo es redondeado y ancho, su núcleo es redondeado o alargado dependiendo del aislado y se localiza en la parte media del parásito

(Guerrero, 1931; Osório et al., 2008). El cinetoplasto, que contiene el ADN mitocondrial, varía de forma circular a elíptica y se ubica en una posición terminal, sub terminal o marginal (Gonzatti et al., 2014). Las mediciones de *T. vivax* realizadas en aislados africanos y sudamericanos muestran una variación significativa en su longitud, encontrándose que desde la punta del flagelo hasta el extremo terminal oscila entre 18 y 31  $\mu\text{m}$  (Osório et al., 2008). Para el diagnóstico directo con microscopio óptico resulta útil la distinción de *T. vivax* por medio de su gran cinetoplasto y su cruce rápido en el campo de visión en sangre fresca (Gonzatti et al., 2014).

### **Transmisión**

En el Continente Africano, los vectores del parásito son moscas del género *Glossina* y el desarrollo de los tripanosomas ocurre en la proboscis de la mosca (Magez & Radwanska, 2014). Por otro lado, se ha observado que en las zonas en donde no hay presencia de la mosca tse-tsé, como en América del Sur y Central, la transmisión ocurre de forma mecánica por medio de moscas picadoras entre las que se encuentran las moscas hematófagas de la familia Tabanidae y las moscas del género *Stomoxys* (Desquesnes, 2017; Gonzatti et al., 2014).

La transmisión mecánica ocurre cuando una mosca con piezas bucales contaminadas con sangre que contiene parásitos vivos cambia rápidamente de huésped para alimentarse, lo cual permite que los parásitos se transmitan sin formas intermedias específicas de insectos (Radwanska et al., 2018). En este caso el proceso de multiplicación y diferenciación del parásito ocurre en el hospedador vertebrado y no en el vector (Gonzatti et al., 2014). *T. vivax* se reproduce por fisión binaria longitudinal (Terán & Sota, 1997).

La prevalencia de este parásito muestra variación considerable según la geografía, hospedadores y presencia de moscas tse-tsé o moscas chupadoras de sangre. En los países de América Latina, en donde no están presentes las moscas tse-tsé, la prevalencia de *T. vivax* se encuentra entre el 2

y 10 % y varía de acuerdo a la abundancia de moscas picadoras y las condiciones climáticas de la zona (Bezie, 2015).

En un estudio realizado en el año 2021 acerca de la prevalencia de *T. vivax* en moscas hematófagas recolectadas en diferentes zonas del Ecuador, se encontró que el 28,57 % de las muestras recolectadas fue positiva para *T. vivax* (Jumbo, 2021). En otra investigación que tuvo lugar en el mismo año, se analizó la prevalencia de *T. vivax* en bovinos mediante diferentes técnicas para su diagnóstico, el autor concluye que en la provincia de Napo en Ecuador existe una prevalencia del 19.57 %, 17.39 % y 36.96 % utilizando prueba de Woo, frotis sanguíneo y pruebas moleculares, respectivamente. Asimismo señaló que en las muestras analizadas en las provincias de Santo Domingo de los Tsáchilas, Esmeraldas y Manabí no se encontró muestras positivas a *T. vivax* (Caiza, 2021).

### ***Patogenia y sintomatología***

El periodo de incubación de *T. vivax* es variable y oscila de 4 a 40 días. Los animales infectados por el tripanosoma presentan cambios drásticos en el sistema linfático, siendo la anemia el cuadro clínico más predominante. La anemia se desarrolla cuando la parasitemia está en su nivel más elevado y tiene un efecto hemolítico grave debido a la destrucción de glóbulos rojos mediante la fagocitosis (Terán & Sota, 1997).

Existen tres formas clínicas de la enfermedad: la hiperaguda que se caracteriza por hemorragias y mortalidad, la crónica en donde los signos principales son la pérdida de peso y el desarrollo de anemia, y la subclínica que desaparece sin necesidad de tratamiento (Terán & Sota, 1997).

### ***Diagnóstico molecular***

De acuerdo al Manual Terrestre de la Organización Mundial de Sanidad Animal, (2021), los métodos recomendados para la identificación del agente infeccioso son la técnica de centrifugación del

hematocrito o conocida también como método de Woo y la detección de ADN mediante pruebas moleculares.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una técnica que utiliza una enzima termoestable llamada *Taq* polimerasa la cual sintetiza una nueva hebra de ADN tomando como molde una plantilla de ADN original (Mullis et al., 1986). Esta herramienta es útil para el diagnóstico de infecciones y se ha utilizado para la detección de tripanosomas en animales y humanos, así como en los vectores del parásito (Desquesnes & Dávila, 2002). La PCR muestra una alta capacidad para la detección de *T. vivax* incluso en periodos sin parasitemia (Cadioli et al., 2012).

Se ha determinado que cuando se utilizan secuencias específicas altamente repetitivas de ADN nuclear (también llamado ADN satélite) la PCR puede detectar entre 1 a 10 tripanosomas/mL de sangre (Desquesnes & Dávila, 2002). También se han utilizado cebadores para amplificar la región ITS1 de ADN ribosómico que detectan entre 50 a 100 tripanosomas/ml de sangre (Desquesnes et al., 2001).

Cortez et al., en el año 2009 establecieron un ensayo de PCR basado en la secuencia del gen de la cisteína proteasa catepsina L-like (CatL-like) específica de *T. vivax*, que demostró ser específica y altamente sensible considerándola una herramienta útil para estudios epidemiológicos de *T. vivax*, ya que puede detectar poblaciones de América del Sur y África Occidental y Oriental lo cual es útil para el diagnóstico de distintos genotipos dentro de esta especie.

### **Tratamiento**

Para el control de las tripanosomosis animales se utilizan tratamientos curativos o profilácticos (Dagnachew et al., 2017). No obstante, muchos de los tripanocidas veterinarios disponibles son inadecuados ya que no todos están autorizados actualmente y su uso es restringido cuando aparecen resistencias incluso de bajo nivel (Giordani et al., 2016).

Para el tratamiento de la tripanosomosis los tripanocidas más utilizados son el diaceturato de diminazeno y el cloruro de isometamidium, aun así cada vez hay una mayor cantidad de informes que indican resistencia a estos productos químicos lo cual demuestra que su utilidad futura está en riesgo (Delespaux & de Koning, 2007). En Brasil, los fármacos diaceturato de diminazeno y el cloruro de isometamidium se encuentran aprobados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA) (Kayo et al., 2021)

**Diaceturato de Diminazeno (DIM).** Este fármaco pertenece a los compuestos de diamida, posee actividad profiláctica a corto plazo con una vida media de eliminación de  $107.5 \pm 8.50$  horas en terneros (Cossic et al., 2017). Es relativamente barato, ampliamente disponible, posee efectos secundarios tóxicos relativamente bajos, además es efectivo contra la tripanosomosis y babesiosis; estas notables ventajas a menudo hacen que sea el medicamento de primera línea para las enfermedades en ganado (Delespaux & de Koning, 2007). En un estudio realizado en Brasil se describen reportes de campo indicando la ineficacia de este fármaco para atacar a *T. vivax*, esto debido posiblemente a cepas resistentes a estos compuestos (Bastos et al., 2020).

Se cree que el principal mecanismo bioquímico de la acción tripanocida de este fármaco es la unión al ADN del cinetoplasto dando lugar a una pérdida irreversible del ADNk (ADN mitocondrial) (Kuriakose et al., 2012), ya que su unión provoca inhibición de la replicación y la pérdida del cinetoplasto posiblemente debido al efecto inhibitorio sobre la topoisomerasa II mitocondrial (Portugal, 1994).

**Cloruro de Isometamidium (ISO).** Es una fenantridina híbrida con propiedades anfífilas y catiónicas (Peregrine et al., 1997). Este fármaco es de uso terapéutico así como profiláctico y desde que se dio a conocer en 1960 se ha mantenido disponible para la quimioprofilaxis y no ha sido suspendido como otros fármacos similares debido a problemas relacionados con la toxicidad y la resistencia (Andrew S. Peregrine, 1994). Se usa principalmente para tratar y prevenir infecciones causadas por

*Trypanosoma congolense*, y *T. vivax* en ganado en África; la duración de la actividad profiláctica en bovinos suele variar de dos a tres meses e incluso hasta seis meses, dependiendo de factores como la formulación, la dosis utilizada, la cepa del parásito, la raza del animal y su estado de salud (Delespaux & de Koning, 2007).

La persistencia de los residuos del cloruro de isometamidium es mucho más prolongada que la del diaceturato de diminazeno. Debido a esto la FAO, (2004) estableció un tiempo de espera de 30 días para el consumo de productos derivados de bovinos tratados con este fármaco.

**Dipropionato de Imidocarb (IMI).** Se ha reportado que este fármaco es eficiente para el tratamiento terapéutico y profiláctico de la anaplasmosis y babesiosis para eliminar los parásitos causantes de la enfermedad en bovinos portadores crónicamente infectados (Adams et al., 1980). No existe mucha información acerca del uso del dipropionato de imidocarb contra *T. vivax*. En un ensayo realizado por Bastos et al., (2020), en el cual se utiliza dipropionato de imidocarb con una dosis de 4.8 mg/kg en ganado infectado experimentalmente se concluye que este fármaco no es efectivo contra *T. vivax*.

### Capítulo III: Metodología

Para realizar el presente estudio se contó con el Aval del Comité de Ética en el Uso de Animales en Investigación y Docencia de la Universidad San Francisco de Quito, Oficio No 2021-009.

#### Revisión Bibliográfica

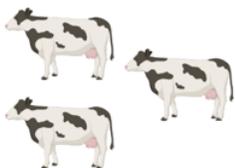
Se realizó la revisión bibliográfica acerca de la tripanosomosis por *T. vivax*, los reportes realizados en el país acerca de esta infección en bovinos, la sintomatología de la enfermedad, los fármacos que se utilizan, infecciones experimentales, y la metodología empleada para el diagnóstico molecular.

#### Unidades de Estudio

Para el presente proyecto se trabajó con muestras sanguíneas provenientes de una infección experimental con *T. vivax* en 15 bovinos machos menores a 5 meses de edad. Los animales estaban distribuidos en tres grupos experimentales con tres bovinos en cada grupo, un bovino donante, un bovino control positivo dentro del corral, un bovino control negativo dentro del corral, y tres bovinos como controles negativos fuera del corral (Figura 1). Los bovinos se encontraban en la carrera de ingeniería agropecuaria IASA I.

**Figura 1**

*Organización de las unidades de estudio*

			
<b>Donante</b>	<b>Control positivo dentro del corral</b>	<b>Control negativo dentro del corral</b>	<b>Controles negativos fuera del corral</b>
			
<b>Dipropionato de imidocarb (IMI)</b> 4.8 mg/kg	<b>Diaceturato de diminazeno (DIM)</b> 7 mg/kg	<b>Cloruro de Isometamidium (ISO)</b> 1 mg/kg	

El bovino donante fue inoculado siete días antes que el resto de los bovinos con sangre proveniente de un borrego el cual fue infectado previamente con una cepa nativa crío preservada de *T. vivax*. Una vez que el animal donante alcanzó el primer pico de parasitemia,  $5.5 \times 10^6$  tripanosomas por mL, se extrajo sangre de la vena yugular y se inoculó a cada bovino de los grupos experimentales de tratamiento y al bovino control positivo,  $1 \times 10^6$  tripanosomas. A los ocho días luego de la infección experimental (posterior al primer pico de parasitemia) los bovinos de los tres grupos experimentales fueron tratados con tres medicamentos comerciales como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2**

*Medicamentos utilizados para el tratamiento de los bovinos durante la infección experimental*

<b>Nombre comercial</b>	<b>Principio activo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Dosis aplicada</b>
Imidopar® (Kyrovet S. A., Colombia)	Dipropionato de imidocarb (IMI)	150 mg/mL	4.8 mg/kg
Berenil® (Intervet S. A., Alemania)	Diaceturato de diminazeno (DIM)	70 mg/mL	7 mg/kg
Hemoveex® (Reveex Laboratories, Venezuela)	Cloruro de isometamidium (ISO)	24 mg/mL	1 mg/kg

### **Recolección de Muestras Sanguíneas**

Las muestras sanguíneas de los bovinos fueron tomadas por punción de la vena yugular en un tubo con anticoagulante EDTA, luego fueron trasladadas al Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE en donde se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento y después se almacenaron a -20 °C. Las muestras se recolectaron antes de la infección para verificar que los bovinos estén libres de hemopatógenos (*Trypanosoma* spp., *Babesia* spp., y *Anaplasma marginale*) y a partir del día de la inoculación (día 0) se tomaron muestras de sangre diarias en el bovino donante durante los primeros siete días de infección y luego dos veces por semana durante un periodo de: 49 días en el bovino donante; 46 días en el bovino control positivo; y 42 días en el bovino control negativo dentro del corral, en los bovinos controles negativos fuera del corral y en los bovinos de los grupos tratados con los tres medicamentos (dipropionato de imidocarb, diaceturato de diminazeno y cloruro de isometamidium), con el objetivo de identificar la presencia del parásito inoculado a lo largo del ensayo.

### **Extracción de ADN a partir de sangre total**

La extracción de ADN de muestras de sangre se llevó a cabo siguiendo el protocolo del kit comercial GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Scientific, USA) con ligeras modificaciones que se indican a continuación:

Para la lisis celular se añadió 400  $\mu\text{L}$  de solución de lisis y 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K a 200  $\mu\text{L}$  de sangre total y se mezcló por vortex, luego se incubó la mezcla por 10 minutos a 56 °C y 300 rpm en un termobloque con agitación (Thermo Scientific, USA). Luego, se añadió 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto y se mezcló por inversión.

Posteriormente se transfirió el lisado a una columna de purificación (incluida en el kit), se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm en una microcentrífuga (Hettich, Alemania), se descartó el tubo de colección y se colocó la columna en un nuevo tubo. Se añadió 500  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado I, se centrifugó por 1 minuto a 10000 rpm y se descartó el flujo de desecho del tubo de colección. Se añadió 500  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado II a la columna, se centrifugó por 3 minutos a 14000 rpm y se descartó el flujo de desecho. Se volvió a centrifugar la columna con el tubo de colección durante 1 minuto a 14000 rpm para descartar cualquier residuo de las soluciones de lavado. Luego, se descartó el tubo de colección y se colocó la columna en un tubo estéril de 1,5 mL.

Finalmente, para eluir el ADN se añadió 50  $\mu\text{L}$  del buffer de elución en el centro de la columna, se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm, se realizó el mismo procedimiento al añadir 20  $\mu\text{L}$  y 15  $\mu\text{L}$  del buffer de elución respectivamente, dando un volumen total de 85  $\mu\text{L}$ . Se descartó la columna de purificación y se procedió a verificar la integridad del ADN.

## **Integridad y cuantificación del ADN**

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 0.8 % teñido con SYBR™ Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA), se cargó 3 µL de cada muestra de ADN con 1 µL de buffer de carga DNA gel loading dye (6x) (Thermo Scientific, USA) y se dejó correr en una cámara de electroforesis durante 45 minutos a 300 mA y 120 V. El gel se visualizó en el fotodocumentador Chemidoc™ Touch Imaging System (BioRad, USA).

El ADN se cuantificó mediante espectrofotometría UV en un espectrofotómetro Miltiskan SkyHigh Microplate (Thermo Fisher Scientific, USA), se colocó 3 uL de ADN en cada pocillo de la microplaca, excepto en el primero, en el cual se colocó 3 uL de buffer de elución utilizado en la extracción de ADN. Se realizó la medición programando el equipo para ácidos nucleicos 260 nm y se los datos fueron registrados en el software SkanIt (Thermo Scientific, USA). La concentración del ADN fue dada en unidades µg/mL y la pureza fue determinada con la relación 260/230 que indica contaminantes químicos y la relación 260/280 que indica contaminación con proteínas.

## **Diagnóstico molecular**

Previo a la infección experimental se determinó la presencia de hemotrópicos *Babesia* spp., *A. marginale*, *T. theileri*, *T. evansi* y *T. vivax*, para descartar que los animales estén infectados con estos hemopatógenos. Luego de la infección experimental y durante la administración de diacetato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium se diagnosticó *T. vivax* para realizar el seguimiento molecular de la infección.

### ***PCR convencional para diagnóstico de Babesia spp.***

Para este ensayo se utilizaron los cebadores PIRO-A 5' AAT ACC CAA TCC TGA CAC AGGG 3' y PIRO-B 5' TTA AAT ACG AAT GCC CCC AAC 3' descritos previamente por Olmeda et al., (1997), los cuales amplifican un fragmento de 408 pb de la subunidad pequeña 18S del ARN ribosomal de *Babesia* spp. La

concentración de los reactivos necesarios para la amplificación fueron en base a la metodología utilizada por Medina et al., (2017) estandarizada en el Laboratorio de Biotecnología Animal con algunas modificaciones; consistió en 1x de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA) que incluye dNTPs y MgCL<sub>2</sub>, 0.25 μM de cada cebador, 1 μL de ADN y agua destilada libre de ADNasa/ARNasa UltraPure (Invitrogen, USA), dando un volumen final de 25 μL en cada tubo de reacción. Como control positivo se utilizó una muestra positiva para *Babesia* spp. y como control negativo una muestra negativa para *Babesia* spp., las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Animal. Las condiciones óptimas empleadas para la reacción se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3**

*Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Babesia spp.*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	61	1	35
Extensión	72	0,5	35
Extensión final	72	5	1
Mantenimiento	4	∞	-

***PCR convencional para el diagnóstico de A. marginale***

Para el diagnóstico de *A. marginale* se utilizó los cebadores 19 A 5' GTG TTC CTG GGG TAC TCC TA 3' y 19 B 5' TGA TCT GGT CAG CCC CAG CT 3' detallados previamente por Reyna-Bello et al., (1998) que amplifican un fragmento de 714 pb del gen msp5. Las concentraciones de los reactivos necesarios para la amplificación se utilizaron según la metodología descrita por Tana-Hernández et al., (2017) y con

modificaciones optimizadas en el Laboratorio de Biotecnología Animal que consistían en en 1x de GoTaq Green Master Mix (Promega, USA) que incluye dNTPs y MgCL<sub>2</sub>, 0.50 μM de cada cebador, 1 μL de ADN y agua destilada libre de ADNasa/ARNasa UltraPure (Invitrogen, USA), dando un volumen final de 25 μL en cada tubo de reacción. Como control positivo se utilizó una muestra positiva para *A. marginale*, y como control negativo una muestra negativa para *A. marginale*, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Animal. Las condiciones utilizadas para la amplificación del gen *msp5* se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4**

*Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Anaplasma marginale*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	0.75	35
Hibridación	64	0.5	35
Extensión	72	1	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	-

***PCR convencional para el diagnóstico de T. theileri***

Para el diagnóstico de *T. theileri* se utilizaron los cebadores TthCATL1 5' CGT CTC TGG CTC CGG TCA AAC 3' y DTO 155 5' TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT GAT CCA GTA 3' previamente descritos por (A. C. Rodrigues et al., 2010), los cuales dan como resultado una secuencia de aproximadamente 273 pb. Las concentraciones y reactivos necesarios para la amplificación se utilizaron según la metodología descrita por Rodrigues et al., (2010) con algunas modificaciones optimizadas en el Laboratorio de

Biología Animal que consistían en 1x de GoTaq Green Master Mix que incluye dNTPs y MgCL<sub>2</sub>, 0.50 μM de cada cebador, 2 μL de ADN y agua destilada libre de ADNasa/ARNasa UltraPure (Invitrogen, USA), dando un volumen final de 25 μL en cada tubo de reacción. Como control positivo se utilizó una muestra positiva para *T. theileri* y como control negativo una muestra negativa para *T. theileri*, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biología Animal. Las condiciones de reacción empleadas se indican en la Tabla 5.

**Tabla 5**

*Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Trypanosoma theileri*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	0.5	45
Hibridación	64	0.5	45
Extensión	72	0.5	45
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	-

***PCR convencional para el diagnóstico de T. evansi***

Para el diagnóstico de *T. evansi* se utilizaron los cebadores ESAG F 5' ACA TTC CAG CAG GAG TTG GAG 3' y ESAG R 5' CAC GTG AAT CCT CAA TTT TGT 3' descritos por Braem, (1999) citado por Holland et al., (2001); OIE, (2017), que amplifican un fragmento de 237 pb de ADN genómico de *T. evansi*. Las concentraciones y reactivos necesarios para la amplificación se utilizaron según lo descrito por (Holland, 2003), con algunas modificaciones optimizadas en el en el Laboratorio de Biología Animal que consistió en 1x de GoTaq Green Master Mix que incluye dNTPs y MgCL<sub>2</sub>, 0.50 μM de cada cebador, 1 μL

de ADN y agua libre de nucleasas, dando un volumen final de 25  $\mu$ L en cada tubo de reacción. Como control positivo se utilizó un plásmido con el fragmento de interés y como control negativo una muestra negativa para *T. evansi*, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Las condiciones de reacción empleadas se indican en la Tabla 6.

**Tabla 6**

*Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Trypanosoma evansi*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	4	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	65	1	35
Extensión	72	0.5	35
Extensión final	72	5	1
Mantenimiento	4	$\infty$	-

**PCR convencional para el diagnóstico de *T. vivax***

La identificación de *T. vivax* se realizó mediante la amplificación de un fragmento del gen CatL-like utilizando los primers TviCatL 5' GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA 3' y DTO 155 5' TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT GAT CCA GTA 3', expuestos por Cortez et al., (2009). Las concentraciones y reactivos utilizados para la reacción se hicieron en base a los descrito por (Chávez-Larrea et al., 2021; Cortez et al., 2009), con modificaciones optimizadas en el Laboratorio de Biotecnología Animal. El volumen total en cada tubo de reacción fue de 1x de GoTaq Green Master Mix que incluye dNTPs y MgCL<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L de ADN y agua destilada libre de ADNasa/ARNasa UltraPure (Invitrogen, USA). Como

control positivo se utilizó una muestra positiva para *T. vivax* y como control negativo una muestra negativa para *T. vivax*, proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Animal. Las condiciones de reacción empleadas se indican en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Condiciones de amplificación por PCR para la detección de Trypanosoma vivax*

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	65	1	35
Extensión	72	0.5	35
Extensión final	72	10	1
Mantenimiento	4	∞	-

***Visualización de los productos de PCR***

Para la visualización de los productos amplificados por PCR se realizó una electroforesis horizontal para lo cual se cargaron los amplicones en un gel de agarosa teñido con SYBR® Safe (Invitrogen, USA) utilizando como buffer de corrida TBE 1X, para *Babesia* spp. y *A. marginale* la concentración de gel agarosa fue de 1.5 % y se corrió durante 50 minutos a 300 mA y 120 V, mientras que para *T. vivax*, *T. theileri* y *T. evansi* el gel de agarosa fue al 2 % y se corrió durante 60 minutos a 300 mA y 110 V. Luego de la corrida, los geles se visualizaron en el fotodocumentador Chemidoc™ Touch Imaging System (BioRad, USA).

## Capítulo IV: Resultados

### Verificación de la ausencia de *T. vivax* previo a la infección experimental

Antes de realizar el diagnóstico mediante PCR se cuantificó y se determinó la pureza e integridad de las muestras de ADN. En la concentración de ADN se determinó una media de 21.63 µg/mL, con valores distribuidos entre 4.10 y 57.30 µg/mL, en cuanto a la pureza, la relación A260/280 (valor aceptado ~1.8) tuvo un valor promedio de 1.6 y la relación A260/A230 (valor aceptado 2.0–2.2) fue de 1.66. Con respecto a la integridad del ADN, se observaron bandas intensas y definidas sin indicios de degradación (Apéndice 1).

Previo a la infección experimental se verificó la ausencia de *T. vivax* en los 15 bovinos del estudio mediante la prueba molecular TviCatL PCR (Apéndice 2), ya que se demuestra la ausencia de un fragmento de 177 pb del gen de las cisteína proteasas (CatL-like). Además, se pudo evidenciar que los 15 bovinos fueron negativos a las pruebas de PCR que identificaron *Babesia* spp., *A. marginale*, *T. theileri*, *T. evansi* (Apéndice 3-6).

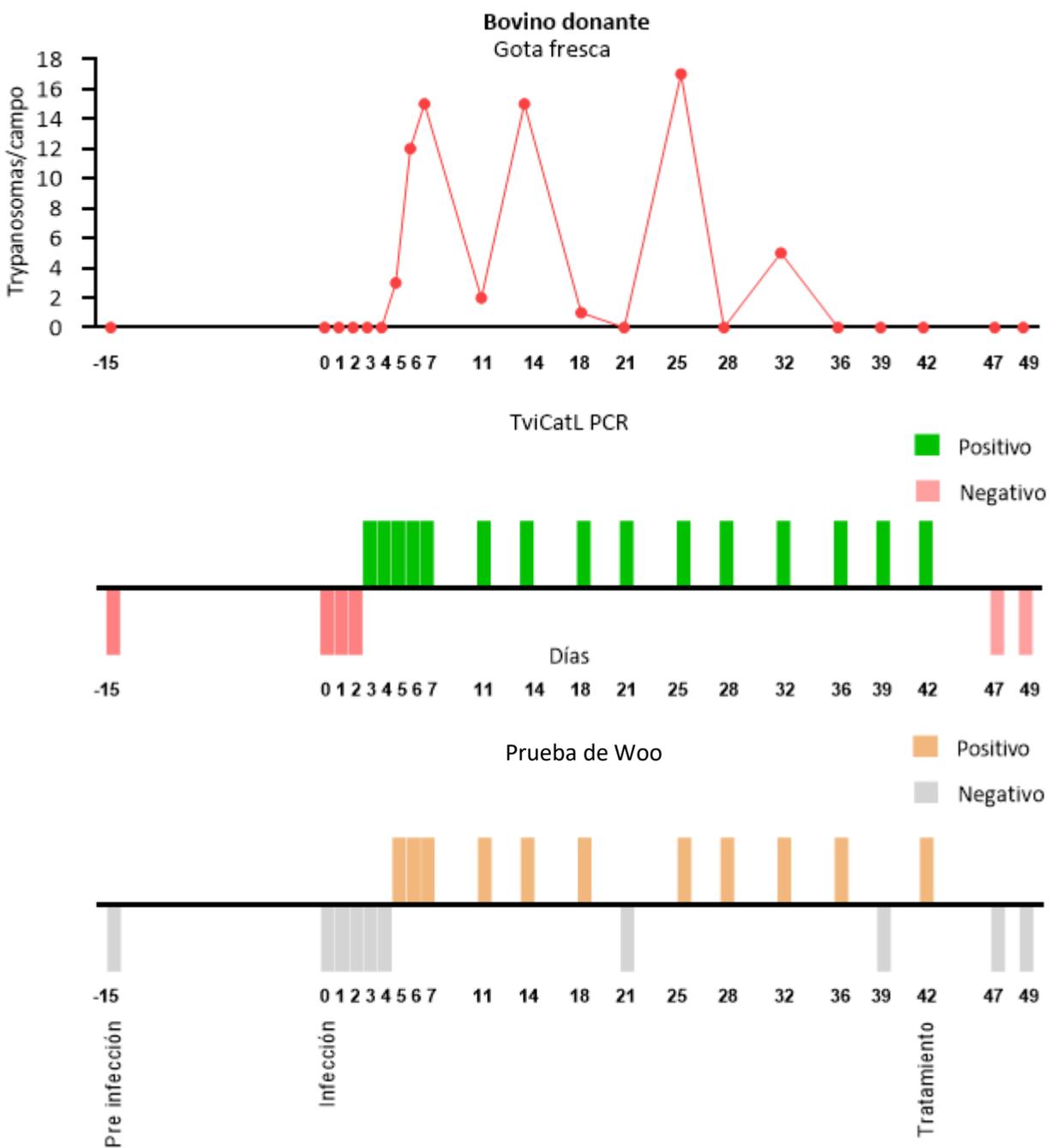
### Trazabilidad de la infección experimental con *T. vivax*

Para evaluar la trazabilidad de la infección experimental se determinó la presencia de *T. vivax* a lo largo del estudio en las muestras de ADN de los bovinos: donante, control positivo, y controles negativos dentro y fuera del corral. Los resultados se muestran representados como una línea de tiempo en donde se señala la presencia o ausencia de *T. vivax* para cada bovino durante el estudio.

En cuanto al seguimiento del bovino donante se evidenció ADN mediante TviCatL PCR a partir del día 3 hasta el día 42 post infección; el día 42 fue tratado con una dosis de 1 mg/kg de peso de cloruro de isometamidium y en los días 47 y 49 post infección se comprobó la ausencia del parásito (Figura 2). Además, se realizó una comparación con los resultados obtenidos mediante la técnica de gota fresca y prueba de Woo.

Figura 2

Curso de la infección experimental con *T. vivax* mediante gota fresca, TviCatL-PCR y prueba de Woo en el bovino donante

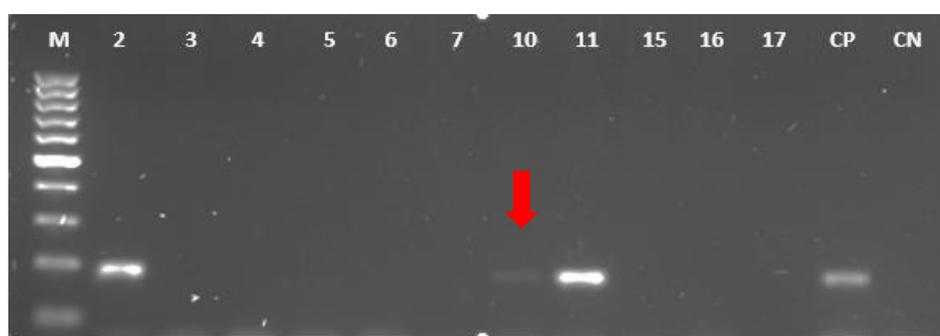


Nota: Tratamiento con cloruro de isometamidium

Entre los resultados obtenidos de la visualización de los amplicones mediante electroforesis horizontal se destaca que en el día 39 post infección del bovino donante se observó una banda tenue del producto de ADN amplificado de *T. vivax* (Figura 3).

### Figura 3

*Resultados de la prueba TviCatL PCR del día 32 post infección de los bovinos de la infección experimental y día 39 post infección del bovino donante*

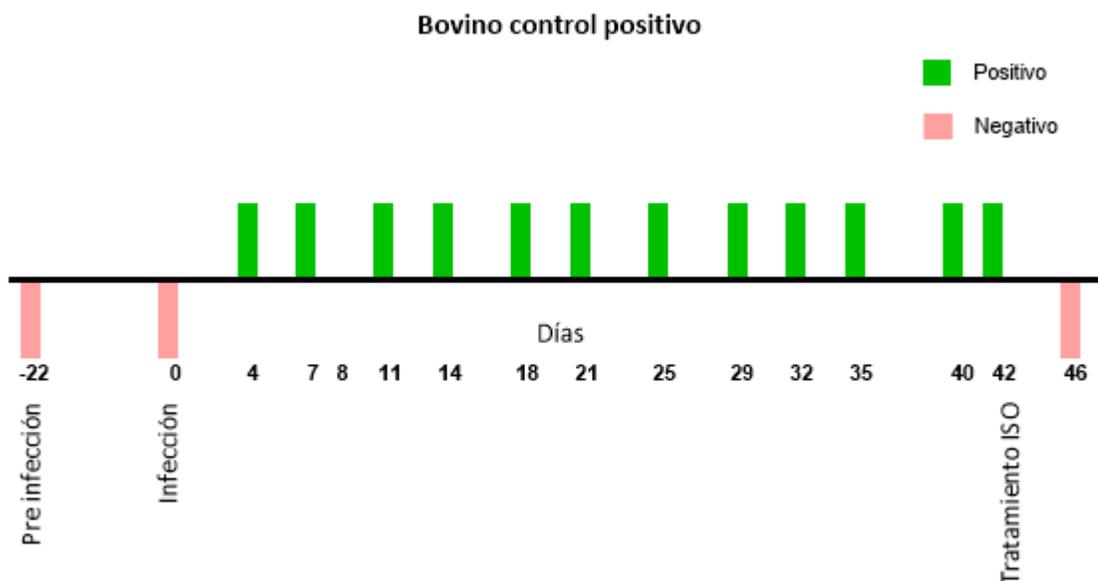


*Nota:* **M:** marcador de peso molecular de 1 kb; **muestra 2:** bovino perteneciente al tratamiento con IMI; **muestra 3, 5:** bovinos pertenecientes al tratamiento con ISO; **muestra 4, 7:** bovinos pertenecientes al tratamiento con DIM; **muestra 6:** bovino control negativo de la infección experimental; **muestra 10:** bovino donante; **muestra 11:** bovino control positivo de la infección experimental; **muestras 15, 16, 17:** bovinos controles negativos fuera del corral; **CP:** control positivo; **CN:** control negativo.

Por otro lado, en el bovino control positivo se detectó ADN de *T. vivax* desde el día 4 hasta el día 42 post infección; fue tratado en el día 42 con una dosis de 1 mg/kg de peso de cloruro de isometamidium y posteriormente en el día 46 post infección se verificó la ausencia del parásito (Figura 4).

Figura 4

Curso de la infección experimental con *T. vivax* mediante TviCatL-PCR en el bovino control positivo



**Nota: ISO:** Cloruro de isometamidium

El bovino control negativo que se encontraba dentro del corral, así como los tres bovinos control negativo fuera del corral fueron negativos a la prueba TviCatL-PCR a lo largo del estudio ya que estos animales no fueron infectados.

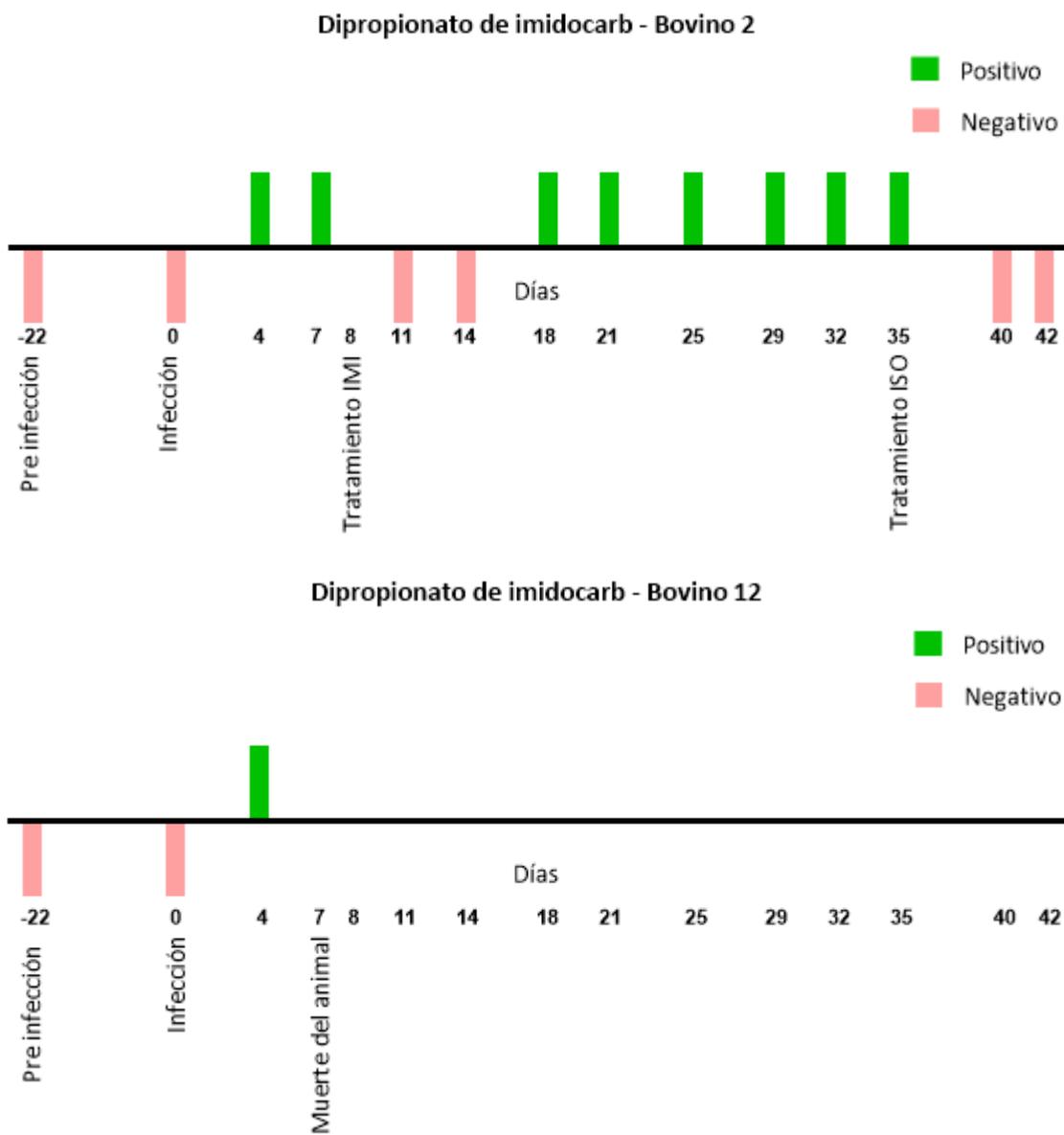
#### **Efectividad del tratamiento con dipropionato de imidocarb (Imidopar®) en los bovinos infectados con una cepa nativa de *T. vivax***

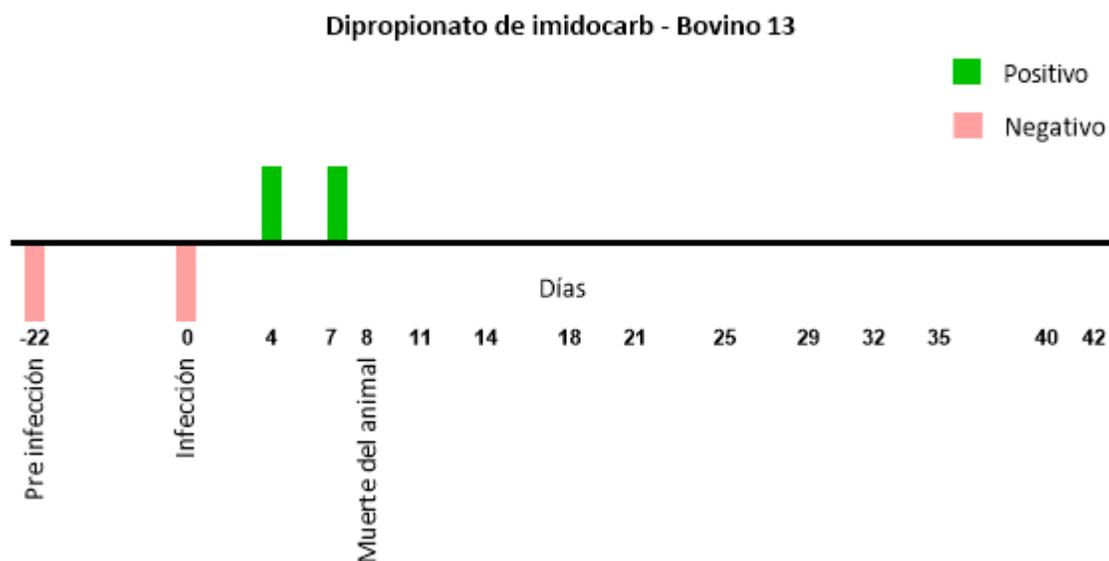
En el día 4 post infección los tres bovinos de este grupo fueron positivos a TviCatL PCR; luego, en el día 8 se aplicó una dosis de 4.8 mg/kg de peso de dipropionato de imidocarb. Como se puede apreciar en la figura 5, el bovino 2 fue negativo en los días 11 y 14 post infección; sin embargo, en el día 18 se detectó nuevamente ADN del parásito y se mantuvo así hasta el día 35 post infección; fue tratado en el día 35 con una dosis de 1 mg/kg de peso de cloruro de isometamidium, y en los días 40 y 42 fue

negativo. El animal 12 y el animal 13 murieron antes de ser tratados en los días 7 y 8, respectivamente (Figura 4).

**Figura 5**

*Curso de la infección experimental con T. vivax mediante TviCatL-PCR en los tres bovinos del grupo de tratamiento con 4.8 mg/kg de peso con dipropionato de imidocarb*





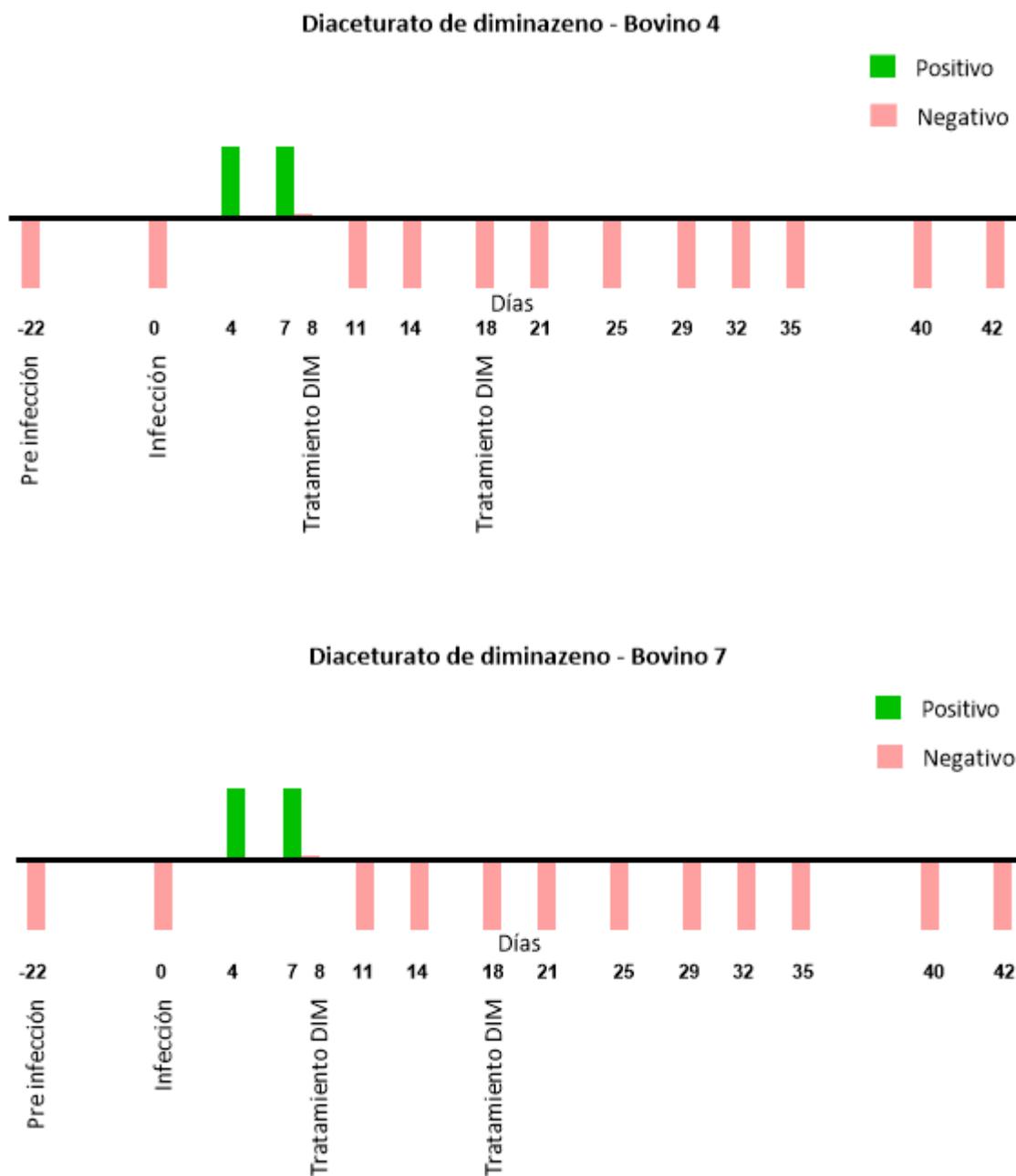
*Nota:* **IMI:** Dipropionato de imidocarb; **ISO:** Cloruro de isometamidium

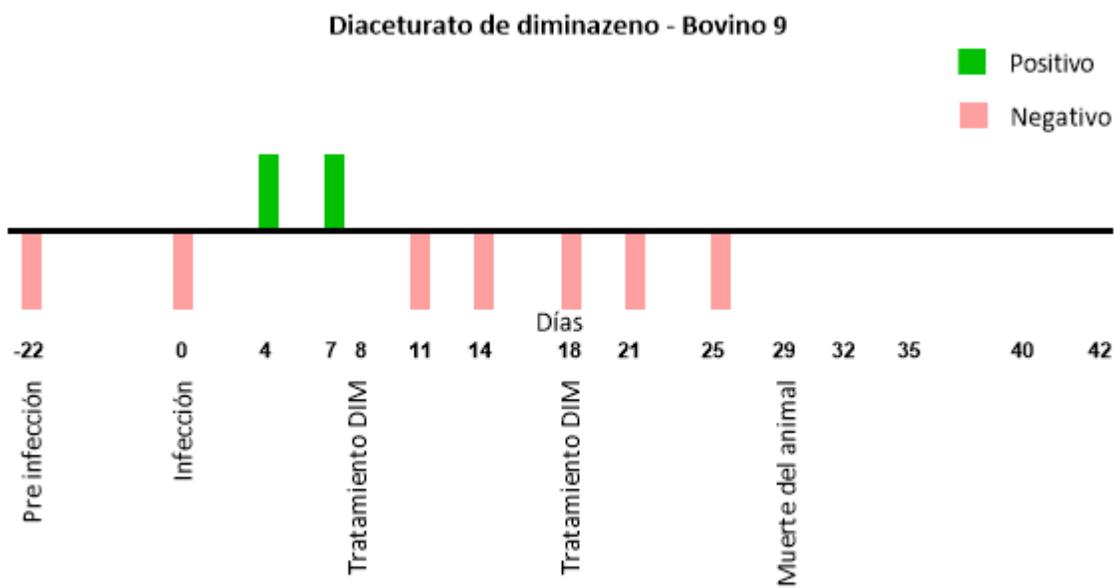
#### **Efectividad del tratamiento con diaceturato de diminazeno (Berenil®) en los bovinos infectados experimentalmente con una cepa nativa de *T. vivax***

En el día 4 post infección los tres bovinos fueron positivos a TviCatL PCR; todos los bovinos recibieron dos dosis de 7 mg/kg de peso de diaceturato de diminazeno, la primera dosis en el día 8 y la segunda en el día 18 post infección; a partir del día 11 no se encontró ADN de *T. vivax* en los bovinos. Se observó que los animales 4 y 7 se mantuvieron negativos hasta el final del estudio (día 42). El bovino 9 murió en el día 25 (Figura 6).

Figura 6

Curso de la infección experimental con *T. vivax* mediante TviCatL-PCR en los tres bovinos del grupo de tratamiento con 7 mg/kg de peso de diaceturato de diminazeno





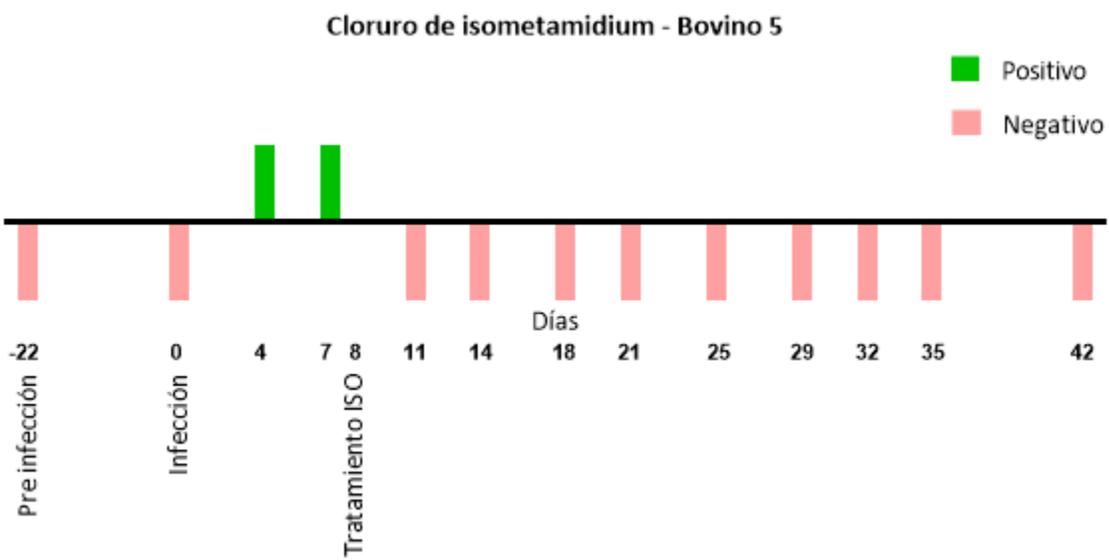
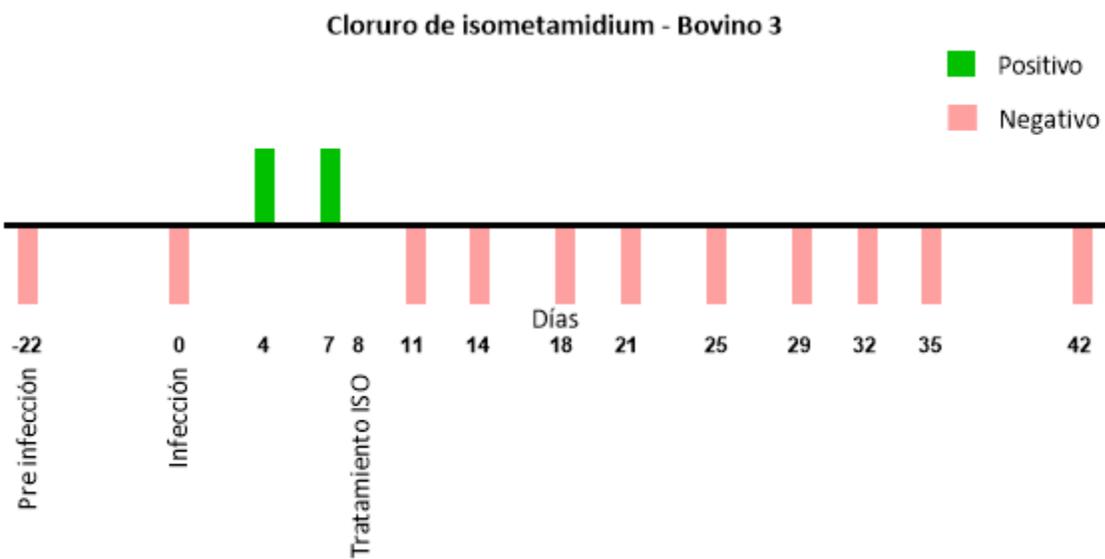
*Nota:* DIM: Diaceturato de diminazeno

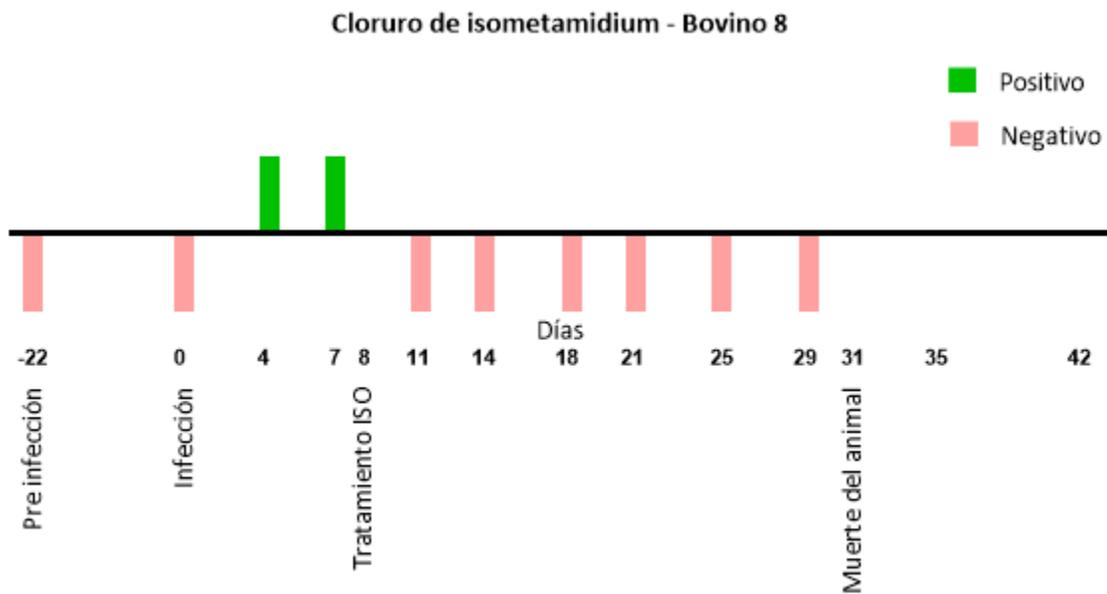
#### **Efectividad de los tratamientos con cloruro de isometamidium (Hemoveex®) en los bovinos infectados experimentalmente con una cepa nativa de *T. vivax***

En el día 4 post infección los bovinos fueron positivos a TviCatL PCR; los tres bovinos recibieron una dosis de 1mg/kg de peso de cloruro de isometamidium en el día 8 post infección; desde el día 11 hasta el día 42 post infección no se encontró ADN de *T. vivax* en los animales 3 y 5. El animal 9 se mantuvo negativo hasta el día 31 en el cual murió (Figura 7).

#### **Figura 7**

*Curso de la infección experimental con *T. vivax* mediante TviCatL-PCR en los bovinos del grupo de tratamiento con 1 mg/kg de peso con cloruro de isometamidium*





*Nota:* **ISO:** Cloruro de isometamidium

## Capítulo V: Discusión

Este es el primer estudio reportado realizado en Ecuador acerca del seguimiento molecular de una infección experimental con *T. vivax* y el tratamiento con tres medicamentos tripanocidas. En el presente estudio se hizo uso de la técnica molecular PCR convencional la cual tiene mayor sensibilidad y especificidad en comparación con técnicas parasitológicas (Habeb et al., 2021; Katabazi et al., 2021). De acuerdo a Sharma et al., (2012) y Taylor et al., (2008) los ensayos de PCR convencional demuestran si existe presencia o ausencia de ADN del parásito a diferencia de los ensayos cuantitativos de PCR en tiempo real (qPCR) que permiten una mejor detección de tripanosomas debido a la cuantificación en tiempo real, sin embargo el costo de la técnica qPCR es mucho más elevado que una PCR convencional.

Para determinar la presencia de *T. vivax* a lo largo de la infección experimental se empleó la prueba TviCatL PCR que amplifica un fragmento de 177 pb del gen de las cisteína proteasas (CatL-like), la cual es específica, altamente sensible y aplicable en un amplio rango de regiones (Cortez et al., 2009). De acuerdo a Rodrigues et al., (2013), con el uso de TviCatL PCR se logró detectar ADN de *T. vivax* en tejidos ováricos de cabras infectadas experimentalmente aun cuando la parasitemia fue negativa por examen de frotis sanguíneo. También, Batista et al., (2009) sugiere que la prueba TviCatL PCR es el método idóneo para diagnosticar tripanosomosis cuando la infección es crónica ayudando así a identificar reservorios de *T. vivax*.

Antes de realizar una infección experimental es necesario corroborar que los bovinos se encuentren sanos y no estén infectados con el parásito a inocular o con parásitos relacionados (J. S. Batista et al., 2011; Murray & Gardiner, 1988; C. M. F. Rodrigues et al., 2013). Por lo cual, previo a la infección experimental, se confirmó que los bovinos del presente estudio fueran negativos a la prueba TviCatL PCR (Apéndice 2). Además, se les realizó pruebas PCR para identificar: *Babesia* spp. utilizando los cebadores PIRO A y PIRO B (Olmeda et al., 1997); *A. marginale* con los cebadores 19 A y 19 B (Reyna-

Bello et al., 1998); *T. theileri* con los cebadores TthCATL1 y DTO 155 (Ortiz et al., 2009) y *T. evansi* con los cebadores ESAG F y ESAG R (Holland et al., 2004) los cuales han sido utilizados exitosamente para la identificación molecular en estudios de prevalencia y análisis filogenéticos (Cueva, 2021; Holland, 2003; Medina et al., 2017; Tana-Hernández et al., 2017), verificando así la ausencia del ADN de estos hemoparásitos en los bovinos previo a la infección experimental (Apéndice 3-6).

Con el fin de evaluar la trazabilidad de la infección experimental se trabajó con un bovino donante y bovinos controles, como se describió anteriormente. El bovino donante y el bovino control positivo se mantuvieron infectados hasta el día 42 post infección, y aunque se obtuvieron bandas tenues de ADN en el día 39 post infección del bovino donante (Figura 3) lo que indica un bajo nivel de parasitemia (J. Batista et al., 2009), la prueba TviCatL PCR fue apta para la detección de *T. vivax* en el transcurso de la infección. Por otro lado, el uso de controles negativos en la infección experimental nos permite asegurar que el proceso de extracción de ADN y la prueba PCR fueron adecuados y sin contaminación (Bastos et al., 2020; C. M. F. Rodrigues et al., 2013), esto se corrobora en el presente trabajo ya que el bovino control negativo dentro del corral al igual que los bovinos controles negativos fuera del corral permanecieron negativos a TviCatL PCR a lo largo del estudio, y por lo tanto la infección experimental fue efectiva.

Según Desquesnes et al., (2022), entre las técnicas directas para la detección microscópica del parásito se encuentra la técnica de gota fresca, la cual es una técnica sencilla que presenta baja sensibilidad y la prueba de Woo que es una de las más sensibles dentro de las pruebas parasitológicas. La PCR es un método altamente sensible y específico, en muestras de campo presenta una prevalencia de hasta tres veces mayor que los métodos parasitológicos (Desquesnes, 2004; Fernández et al., 2009). En el presente estudio, se evidenció en los resultados del bovino donante que mientras con la técnica TviCatL PCR fue posible detectar ADN sin interrupción desde el día 3 hasta el día 42 post infección,

mediante gota fresca y prueba de Woo el día 5 post infección y además no fue posible visualizar microscópicamente al parásito cuando la parasitemia era baja.

De acuerdo a Hines et al., (2015), el dipropionato de imidocarb es el fármaco más utilizado para tratar la piroplasmosis causada por *Theileria equi* y *Babesia caballi*. Asimismo, Bastos et al., (2020) menciona que un problema relacionado con el tratamiento del ganado afectado por *T. vivax* es que los ganaderos suelen ocupar dipropionato de imidocarb para combatir los brotes pese a que los fabricantes no indican que el fármaco sea adecuado para este fin. En el presente estudio, el bovino 2 fue tratado con una dosis de 4.8 mg/kg de peso de dipropionato de imidocarb en el día 8 post infección (Figura 5), sin embargo, el tratamiento con este fármaco no fue efectivo ya que se encontró ADN de *T. vivax* en la sangre del bovino diez días después de haber sido tratado (día 18 post infección), estos resultados concuerdan con lo encontrado por Bastos et al., (2020), el cual menciona que bovinos infectados experimentalmente y tratados con dipropionato de imidocarb recayeron luego de 14 y 28 después de aplicarse el tratamiento. En nuestro estudio no fue posible aplicar el tratamiento en los bovinos 12 y 13 ya que murieron en los días 7 y 8 post infección respectivamente.

El diacetato de diminazeno ha sido utilizado como tratamiento para la tripanosomosis bovina desde 1955 (Kuriakose et al., 2012). En este trabajo, los bovinos tratados con dos dosis de 7mg/kg de peso de diacetato de diminazeno en los días 8 y 18 post infección, no presentaron ADN del parásito luego de haber sido tratados con el fármaco (Figura 6). Aun cuando se han reportado varios casos de resistencia al fármaco en países vecinos (Bastos et al., 2017, 2020), los resultados mostrados en este estudio indican que el tratamiento con dos dosis de 7 mg/kg de peso de diacetato de diminazeno fue efectivo en la infección experimental. Es importante recalcar que existen reportes acerca de la presencia de *T. vivax* en sitios de refugio como el ojo y sistema nervioso central, lo que sugiere que si llegasen a existir infecciones recurrentes luego de un tratamiento farmacológico podrían deberse a estos focos

Los bovinos tratados con cloruro de isometamidium no presentaron ADN de *T. vivax* a partir del día 11 post infección, estos resultados son consistentes con los encontrados por (Bastos et al., 2020) en donde asegura que el tratamiento con 1 mg/kg de cloruro de isometamidium ha sido efectivo para el tratamiento de la infección por *T. vivax*. Mekonnen et al., (2018) señalan que el cloruro de isometamidium es principalmente utilizado como una droga profiláctica que brinda una protección promedio de 3 meses contra la infección por tripanosomas, por lo que sería interesante estudiar a los bovinos durante largos periodos de tiempo para tener resultados más robustos acerca de la efectividad a este fármaco.

A pesar de la existencia de reportes que indican la resistencia de cepas de *T. vivax* a cloruro de isometamidium y a diaceturato de diminazeno (Bastos et al., 2017; Cadioli et al., 2012; Giordani et al., 2016; Kayo et al., 2021), hasta ahora, en Ecuador no ha habido evidencia que demuestre la ineficacia de estos tratamientos. Los resultados aquí mostrados de los bovinos tratados con diaceturato de diminazeno (Figura 8) y los animales tratados con cloruro de isometamidium (Figura 9) muestran que estos fármacos fueron efectivos en bovinos experimentalmente infectados.

## Capítulo VI: Conclusiones

La aplicación de técnicas moleculares como la PCR convencional que amplifica del gen de las catepsinas (TviCatL PCR) fue efectiva para determinar la ausencia de ADN de *T. vivax* en los bovinos previo a su infección experimental.

Mediante la amplificación de los genes: de *Babesia* spp, de *A. marginale*, de *T. theileri* y de *T. evansi* se corroboró que los bovinos se encontraron libres de estos hemoparásitos antes de empezar la infección experimental.

Los resultados obtenidos de la TviCatL PCR del bovino donante mostraron la presencia de ADN a partir del día 3 y en el bovino control desde el día 4 hasta el día 42 post infección, en donde fue aplicado el tratamiento. De igual manera, se evidenció la ausencia del parásito en el control negativo dentro del corral y los bovinos control negativo fuera del corral

El tratamiento con una dosis de 4.8 mg/kg de peso de dipropionato de imidocarb no fue efectivo contra *T. vivax* ya que luego de 10 días de ser aplicado el tratamiento se encontró ADN del parásito en el bovino tratado con este fármaco.

Los bovinos pertenecientes a los grupos de tratamiento con dos dosis de 7 mg/kg de peso de diaceturato de diminazeno y 1 mg/kg de peso de cloruro de isometamidium no presentaron ADN de *T. vivax* luego del tratamiento.

## Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda evaluar los fármacos cloruro de isometamidium y diaceturato de diminazeno en bovinos que se encuentren infectados naturalmente con *T. vivax*, utilizando métodos moleculares, parasitológicos y serológicos.

Analizar las muestras de ADN obtenidas utilizando una PCR cuantitativa para poder determinar el nivel de parasitemia de los animales durante la infección experimental y así tener más control de la eficiencia de los fármacos.

Pese a que los resultados aquí mostrados se contrastan con los resultados expuestos en otros estudios, se sugiere comparar los resultados obtenidos mediante TviCatL PCR con otra técnica molecular.

Se recomienda analizar las muestras conservadas del sistema nervioso central de los animales pertenecientes a la infección experimental para determinar la presencia de *T. vivax* en los sitios de refugio.

### Bibliografía

- Adams, L. G., Corrier, D. E., & Williams, J. D. (1980). A study of the toxicity of imidocarb dipropionate in cattle. *Research in Veterinary Science*, 28(2), 172–177. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)32741-3](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)32741-3)
- Bastos, T., Faria, A., de Assis, A., de Carvalho, D., Beltrán, D., Nicaretta, J., Cruvinel, L., Heller, L., Monteiro, L., Soares, V., Cadioli, F., Lopes, W., & Zanetti, D. (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>
- Bastos, T., Faria, A. M., Madrid, D. M. de C., De Bessa, L. C., Linhares, G. F. C., Fidelis Junior, O. L., Sampaio, P. H., Cruz, B. C., Cruvinel, L. B., Nicaretta, J. E., Machado, R. Z., Da Costa, A. J., & Lopes, W. D. Z. (2017). First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(3), 366–371. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017019>
- Batista, J., Oliveira, A. F., Rodrigues, C. M. F., Damasceno, C. A. R., Oliveira, I. R. S., Alves, H. M., Paiva, E. S., Brito, P. D., Medeiros, J. M. F., Rodrigues, A. C., & Teixeira, M. M. G. (2009). Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 131–135. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.07.005>
- Batista, J. S., Rodrigues, C. M., García, H. A., Bezerra, F. S., Olinda, R. G., Teixeira, M. M., & Soto-Blanco, B. (2011). Association of *Trypanosoma vivax* in extracellular sites with central nervous system lesions and changes in cerebrospinal fluid in experimentally infected goats. *Veterinary Research*, 42(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-63>
- Bengaly, Z., Sidibe, I., Ganaba, R., Desquesnes, M., Boly, H., & Sawadogo, L. (2002). Comparative

- pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: Clinical observations and haematological changes. *Veterinary Parasitology*, *108*(1), 1–19.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00164-4)
- Betancourt, J., López, G., Evanoff, E., Berrío, W., Gómez, J., & Velásquez, A. (2020). Eficacia de la asociación oxitetraciclina - isometamidium en el control de anaplasmosis y tripanosomosis bovina. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, *15*(2), 49–63.  
<https://doi.org/10.21615/cesmvz.15.2.4>
- Bezie, M. (2015). *Review on Trypanosoma vivax*. <https://doi.org/10.5829/idosi.ajbas.2015.7.1.92116>
- Cadioli, F. A., de Athayde Barnabé, P., Machado, R. Z., Teixeira, M. C. A., André, M. R., Sampaio, P. H., Fidélis, O. L., Teixeira, M. M. G., & Marques, L. C. (2012). First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *21*(2), 118–124. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200009>
- Caiza, K. (2021). "Prevalencia del *Trypanosoma vivax* en bovinos provenientes de zonas de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas y Manabí, con previos reportes de enfermedades hemotrópicas [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].  
<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25921/1/T-ESPESD-003171.pdf>
- Cecchi, G., Paone, M., Feldmann, U., Vreysen, M. J., Dially, O., & Mattioli, R. C. (2014). Assembling a geospatial database of tsetse-transmitted animal trypanosomosis for Africa. *Parasites & Vectors*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-39>
- Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R., Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2021). First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(4), 2422–2428. <https://doi.org/10.1111/TBED.13906>
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M.

- M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>
- Cossic, B. G. A., Adjahoutonon, B., Gloaguen, P., Dibanganga, G. L., Maganga, G., Leroy, P., MacLeod, E. T., & Picozzi, K. (2017). Trypanosomiasis challenge estimation using the diminazene aceturate (Berenil) index in Zebu in Gabon. *Tropical Animal Health and Production*, 49(3), 619. <https://doi.org/10.1007/S11250-017-1239-2>
- Cueva, J. (2021). *Prevalencia de Trypanosoma theileri en bovinos provenientes de zonas con previos reportes de enfermedades hemotrópicas* [Universidad de las Fuerzas ARMADAS ESPE ]. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/25913/1/T-ESPESD-003160.pdf>
- Dagnachew, S., Tsegaye, B., Awukew, A., Tilahun, M., Ashenafi, H., Rowan, T., Abebe, G., Barry, D. J., Terefe, G., & Goddeeris, B. M. (2017). Prevalence of bovine trypanosomosis and assessment of trypanocidal drug resistance in tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. *Parasite Epidemiology and Control*, 2(2), 40–49. <https://doi.org/10.1016/J.PAREPI.2017.02.002>
- Delespaux, V., & de Koning, H. P. (2007). Drugs and drug resistance in African trypanosomiasis. *Drug Resistance Updates*, 10(1–2), 30–50. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2007.02.004>
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America*. <https://umr-intertryp.cirad.fr/en/content/download/4580/34514/version/1/file/Livestock+Trypanosomoses+and+their+Vectors+in+Latin+America.pdf>
- Desquesnes, M. (2017). *Compendium of standar diagnostic protocols for animal trypanosomoses of African origin* (Issue October).
- Desquesnes, M., & Dávila, A. M. R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary Parasitology*,

- 109(3–4), 213–231. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4)
- Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazmand, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., Gimonneau, G., Truc, P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Jamonneau, V., Jittapalpong, S., Jacquet, P., Solano, P., & Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites & Vectors*, 15(64). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>
- Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungrana, A., & Dávila, A. M. R. (2001). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 610–614. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00161-8)
- FAO. (2004). Residues of some veterinary drugs in animals and foods. *FAO Food and Nutrition Paper*, 41. <https://www.fao.org/3/y5612e/y5612e00.htm>
- Fernández, D., González-Baradat, B., Eleizalde, M., González-Marcano, E., Perrone, T., & Mendoza, M. (2009). *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Experimental Parasitology*, 121(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2008.09.013>
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001268>
- Godfrey, D. G. (1987). Trypanosomiasis: A veterinary perspective. *Parasitology Today*, 3(6), 194–195. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(87\)90184-0](https://doi.org/10.1016/0169-4758(87)90184-0)
- Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma* (*duttonella*)

- vivax and trypanosomosis in latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In S. Magez & M. Radwanska (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261–285). Springer.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11)
- Guerrero, R. P. (1931). Tripanosoma tipo Cazalboui en el ganado de la Costa Atlántica. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 3(21), 141–153.  
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/remevez/article/view/51520>
- Habeeb, I. F., Chechet, G. D., & Kwaga, J. K. P. (2021). Molecular identification and prevalence of trypanosomes in cattle distributed within the Jebba axis of the River Niger, Kwara state, Nigeria. *Parasites and Vectors*, 14(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-05054-0/FIGURES/4>
- Hines, S. A., Ramsay, J. D., Kappmeyer, L. S., Lau, A. O. T., Ojo, K. K., Van Voorhis, W. C., Knowles, D. P., & Mealey, R. H. (2015). Theileria equi isolates vary in susceptibility to imidocarb dipropionate but demonstrate uniform in vitro susceptibility to a bumped kinase inhibitor. *Parasites & Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0611-6>
- Holland, W. G. (2003). *The diagnosis of Trypanosoma evansi and ITS immunosuppressive effect in water buffaloes and pigs*.
- Holland, W. G., Claes, F., My, L. N., Thanh, N. G., Tam, P. T., Verloo, D., Büscher, P., Goddeeris, B., & Vercruyse, J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for Trypanosoma evansi diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 97(1), 23–33. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00381-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00381-8)
- Holland, W. G., Thanh, N. G., My, L. N., Do, T. T., Goddeeris, B. M., & Vercruyse, J. (2004). Prevalence of Trypanosoma evansi in Water Buffaloes in Remote Areas in Northern Vietnam Using PCR and Serological Methods. *Tropical Animal Health and Production*, 36(1), 45–48.  
<https://doi.org/10.1023/B:TROP.0000009521.13984.17>
- INEC. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua 2021*.

<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiNjk1M2M4Y2UtNmYwOS00MDk1LWlxYzgtNmVzMzM5ODMzODNliiwidCI6ImYxNThhMmU4LWNhZWmtNDQwNi1iMGFiLWY1ZTI1OWJkYTEwMi9&pageName=ReportSection5b660c865b9de068070e>

Jones, T. W., & Dávila, A. M. R. (2001). *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Trends in Parasitology*, 17(2), 99–101. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01777-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01777-3)

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

Katabazi, A., Aliero, A. A., Witto, S. G., Odoki, M., & Musinguzi, S. P. (2021). Prevalence of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* in Lira District, Uganda. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/7284042>

Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2204-7>

Kayo, D. A., Neto, C., Da Cruz, A., Fidelis, O., Junior, F., Walter, B., Marcos, A., Marta, G., Rosangela, M., & Fabiano, C. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 30(1). <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021019>

Kuriakose, S., Muleme, H. M., Onyilagha, C., Singh, R., Jia, P., & Uzonna, J. E. (2012). Diminazene Aceturate (Berenil) Modulates the Host Cellular and Inflammatory Responses to *Trypanosoma congolense* Infection. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048696>

Magez, S., & Radwanska, M. (2014). Trypanosomes and Trypanosomiasis. In *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer-Verlag Wien. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5>

Medina, V., Reyna, A., Tavares, L., Campos, A., Ron, J., Moyano, J., Jarrín, E., Sandoval, E., & Chávez, M.

- (2017). Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. mediante las técnicas de ELISA y PCR en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica FCV LUZ*, 27, 162–171. <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/13472/1/A-ESPE-057312.pdf>
- Mekonnen, G., Mohammed, E. F., Kidane, W., Nesibu, A., Yohannes, H., Van Reet, N., Büscher, P., & Birhanu, H. (2018). Isometamidium chloride and homidium chloride fail to cure mice infected with Ethiopian *Trypanosoma evansi* type A and B. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006790>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(1), 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Murray, M., & Gardiner, P. R. (1988). Extravascular foci of *Trypanosoma vivax* in goats: the central nervous system and aqueous humor of the eye as potential sources of relapse infections after chemotherapy. *Parasitology*, 97(1), 51–61. <https://doi.org/10.1017/S0031182000066737>
- Olmeda, A. S., Armstrong, P. M., Rosenthal, B. M., Valladares, B., Del Castillo, A., De Armas, F., Miguelez, M., González, A., Rodríguez Rodríguez, J. A., Spielman, A., & Telford, S. R. (1997). A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*, 67(3), 229–234. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00045-4)
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021). *Nagana: Infecciones por tripanosomosis salivarianas*. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.14\\_NAGANA.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.14_NAGANA.pdf)
- Ortiz, P. A., Maia da Silva, F., Cortez, A. P., Lima, L., Campaner, M., Pral, E. M. F., Alfieri, S. C., & Teixeira, M. M. G. (2009). Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: Markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta Tropica*, 112(3), 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.036>

- Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Da Costa, S. C. G. (2008). Trypanosoma (Duttonella) vivax: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>
- Peregrine, A. S., Gray, M. A., & Mooloo, S. K. (1997). Cross-resistance associated with development of resistance to isometamidium in a clone of Trypanosoma congolense. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(7), 1604. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.7.1604>
- Peregrine, Andrew S. (1994). Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Veterinary Parasitology*, 54(1–3), 223–248. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90092-2)
- Portugal, J. (1994). Berenil acts as a poison of eukaryotic topoisomerase II. *FEBS Letters*, 344(2–3), 136–138. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00363-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00363-7)
- Radwanska, M., Vereecke, N., Deleeuw, V., Pinto, J., & Magez, S. (2018). Salivarian Trypanosomosis: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System. *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), 2253. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02253>
- Reyna-Bello, A., Cloeckaert, A., Vizcaíno, N., Gonzatti, M. I., Aso, P. M., Dubray, G., & Zygmunt, M. S. (1998). Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(2), 259. <https://doi.org/10.1128/cdli.5.2.259-262.1998>
- Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Ortiz, P. A., Cortez, A. P., Martinkovic, F., Paiva, F., Batista, J. S., Minervino, A. H., Campaner, M., Pral, E. M., Alfieri, S. C., & Teixeira, M. M. G. (2010). Cysteine proteases of Trypanosoma (Megatrypanum) theileri: Cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*, 59(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.002>

- Rodrigues, C. M. F., Olinda, R. G., Silva, T. M. F., Vale, R. G., da Silva, A. E., Lima, G. L., Garcia, H. A., Teixeira, M. M. G., & Batista, J. S. (2013). Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. *Veterinary Parasitology*, *191*(1–2), 146–153. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.08.001>
- Sharma, P., Juyal, P. D., Singla, L. D., Chachra, D., & Pawar, H. (2012). Comparative evaluation of real time PCR assay with conventional parasitological techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in cattle and buffaloes. *Veterinary Parasitology*, *190*(3–4), 375–382. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2012.07.005>
- Stevens, J., & Gibson, W. (1999). The evolution of salivarian trypanosomes. *Rio de Janeiro*, *94*(2), 225–228.
- Tana-Hernández, L., Navarrete-Arroyo, K., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/S12917-017-1311-1>
- Taylor, T. K., Boyle, D. B., & Bingham, J. (2008). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Trypanosoma evansi*, the agent of surra. *Veterinary Parasitology*, *153*(3–4), 255–264. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.01.045>
- Terán, M. V., & Sota, C. A. (1997). La Tripanosomiasis bovina en América Latina y el Caribe. *Veterinaria (Montevideo)*, *33*(136), 17–21. <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/522>
- Vieira, O. L. E., de Macedo, L. O., Santos, M. A. B., Silva, J. A. B. A., de Mendonça, C. L., da Gloria Faustino, M. A., do Nascimento Ramos, C. A., Alves, L. C., Ramos, R. A. N., & de Carvalho, G. A. (2017). Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*,

26(4), 516–520. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017048>

Zapata, R., & Reyes, J. (2011). Tripanosomiasis bovina en hembra de raza especializada en producción de leche de zona alto andina, Antioquia: presentación de un caso. *Hechos Microbiológicos*, 2(2), 81–87. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/view/15063>

## Apéndices