



Evaluación de la cinética de anticuerpos IgG e IgM mediante pruebas serológicas ELISAI y aglutinación, en bovinos experimentalmente infectados con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium.

Espinosa Tenorio, Joselyn Andrea

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Msc. María Augusta Chávez

14 de febrero del 2023

14/02/2023 16:21

Trabajo de titulación estudiante



Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

Revision Tesis OCT 2022 A MARZO 2023

NOMBRE DEL ALUMNO

JOSELYN ANDREA ESPINOSA TENORIO

NOMBRE DEL ARCHIVO

JOSELYN ANDREA ESPINOSA TENORIO - Documento sin título

CREACIÓN DEL INFORME

14 feb 2023

Resumen

Pasajes marcados	0	0 %
Pasajes citados/entrecomillados	1	0.2 %
Coincidencias en la Web		
espe.edu.ec	1	0.2 %

1 pasaje

Pasaje del alumno **ENTRECOMILLADO**

Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y Trypanosomosis en Ecuador (BruTryp

Coincidencia principal en la Web

Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y la sensibilización, al diagnóstico y al desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y de la tripanosomosis en Ecuador -BruTryp...

Proyecto de vinculación con la sociedad 2019 - Ciencias de la Vida <https://decv.espe.edu.ec/proyectos-de-vinculacion-2019/establecimiento-de-una-plataforma-en-apoyo-a-la-formacion-y-la-sensibilizacion-al-diagnostico-y-al-desarrollo-de-una-estrategia-de-control-de-la-brucelosis-y-de-la-tripanosomosis-en-ecuador-brutryp/>



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

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación: **“Evaluación de la cinética de anticuerpos IgG e IgM mediante pruebas serológicas ELISAI y aglutinación, en bovinos experimentalmente infectados con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium”** fue realizado por la señorita **Espinosa Tenorio, Joselyn Andrea**; 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 de 2023

Firma:



M. Sc. Chávez Larrea, María Augusta

C. C.: 0201274842



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

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Espinosa Tenorio, Joselyn Andrea**, con cédula de ciudadanía n°1719131003, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Evaluación de la cinética de anticuerpos IgG e IgM mediante pruebas serológicas ELISAi y aglutinación, en bovinos experimentalmente infectados con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium** 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

Firma

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large loop followed by several vertical strokes, positioned above a horizontal dotted line.

Espinosa Tenorio, Joselyn Andrea

C.C.: 1719131003



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

Autorización de Publicación

Yo **Espinosa Tenorio, Joselyn Andrea**, con cédula de ciudadanía n°1719131003, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación:
Título: Evaluación de la cinética de anticuerpos IgG e IgM mediante pruebas serológicas ELISA y aglutinación, en bovinos experimentalmente infectados con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 14 de febrero del 2023

Firma

Espinosa Tenorio, Joselyn Andrea

C.C.: 1719131003

Dedicatoria

El presente proyecto de titulación está dedicado a:

A Dios, el motor de mi vida y mi mapa.

A mis padres, Ángela y Rommel, mi razón de ser y mis maestros, a ellos mi amor eterno y este trabajo que sin su apoyo no hubiese sido posible.

A mis hermanos: Nathaly, Rommel y Víctor, la luz y la diversión en mi vida.

A mis abuelitos: Lida, Laura, Víctor y Nicanor.

A todos mis tíos, especialmente a mi tía Marina y Rodolfo que han sido como mis segundos padres.

Finalmente a mi eterno compañero de amanecidas, Tomas.

Joselyn Andrea Espinosa Tenorio

Agradecimientos

A Dios por la vida, la fe, el amor y la fortaleza porque ha sido el pilar de mi existencia. Gracias Dios de Amor por jamás soltar mi mano y siempre guiar mi camino.

A mi madre, Ángela, por su cuidado, amor y consejos. Eres la mujer que más admiro y mi razón de ser, gracias por todo tu esfuerzo mamita.

A mi padre, Rommel, por sus palabras de apoyo y sabios consejos. Gracias por estar siempre para mí cuando le he necesitado y apoyar mis decisiones.

A mi hermano, Rommel Jeriel, el hermano que siempre pedí y la vida me obsequio, gracias por llegar a mi vida y llenarla del amor más puro e inocente. Eres mi motivación y mi más grande fortaleza.

A mi prima, Dianita, que ha sido como una hermana y siempre ha estado para mí en todos los momentos.

A Faus, mi amigo desde el primer semestre, gracias por toda tu ayuda en mi vida personal y profesional, que bonito coincidir contigo.

A mis amigos: Raque, Jean, Dai, Fa y Pame por siempre estar para mí en todos los momentos de estudio y de diversión.

A mis amigos del Zoológico de Quito: Vero, Stefy y Sebas, gracias por las risas y por mostrarme que la vida laboral tiene un lado bonito.

Al proyecto de vinculación – investigación para el establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la Brucelosis y trypanosomosis en Ecuador (BruTryp), a cargo de la Academia de

Investigación y Enseñanza Superior (ARES), por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación dentro del proyecto y permitirme aportar a la ciencia en el país.

A la Dra. María Augusta Chávez, por su guía, confianza y apoyo para la realización del presente proyecto de titulación.

Al Dr. Armando Reyna, por siempre estar dispuesto a enseñarme y a solventar todas mis dudas con la mejor actitud, gracias por la confianza y por compartir su conocimiento aportando a mi formación profesional.

Al Dr. Jorge Ron, por recibirme en el laboratorio y brindarme su apoyo durante la elaboración de mi trabajo de titulación.

A los técnicos del laboratorio de Mejoramiento Genético y Sanidad Animal de la sede IASA I y a la Ingeniera Cristina Cholota por su apoyo brindado.

Joselyn Andrea Espinosa Tenorio

Índice de contenido

Dedicatoria.....	6
Agradecimientos	7
Abreviaturas.....	14
Resumen	15
Abstract.....	16
Capítulo I: Introducción	17
Formulación del problema	17
Justificación del problema	18
Objetivos	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos	21
Hipótesis	22
Capítulo II: Marco teórico	22
Trypanosomosis	22
División taxonómica	22
Especies de Trypanosoma en bovinos.....	24
<i>Trypanosoma vivax</i>	25
Ciclo de vida	28
Transmisión en América del Sur	29
Vectores	31
Síntomas	32
Respuesta inmunitaria	33

	10
Diagnóstico	35
Tratamiento.....	38
Capítulo III: Materiales y métodos	39
Participantes.....	39
Zona de estudio.....	40
Duración de la investigación	40
Unidades de estudio.....	40
Trabajo de campo	42
Obtención de muestras sanguíneas de bovinos.....	42
Trabajo de laboratorio	42
Procesamiento de muestras sanguíneas	42
Detección de anticuerpos IgM mediante el kit comercial CATT/ <i>T. evansi</i>	42
Detección de anticuerpos IgG mediante la prueba ELISAI	44
Capítulo IV: Resultados.....	48
Detección de anticuerpos IgM mediante el kit comercial CATT/ <i>T. evansi</i>	48
Detección de anticuerpos IgG mediante la prueba ELISAI	53
Capítulo V: Discusión.....	60
Capítulo VI: Conclusiones	67
Capítulo VII: Recomendaciones	67
Bibliografía	69
Apéndices	80

Índice de tablas

Tabla 1 <i>División taxonómica de T. vivax</i>	23
Tabla 2 <i>Especies de Trypanosoma que afectan al ganado bovino</i>	24
Tabla 3 <i>Organización de las unidades de estudio</i>	41
Tabla 4 <i>Tabla de reactivos del kit comercial CATT/T. evansi</i>	42
Tabla 5 <i>Soluciones utilizadas en la prueba ELISAI para T. vivax</i>	44
Tabla 6 <i>Protocolo de la prueba ELISAI para la detección de IgG de T. vivax</i>	46

Índice de figuras

Figura 1 Secciones del género <i>Trypanosoma</i>	23
Figura 2 Comparación morfológica de <i>T. vivax</i> , <i>T. congolense</i> y <i>T. brucei</i>	25
Figura 3 Distribución de <i>T. vivax</i> a nivel mundial.....	26
Figura 4 Variación del ciclo de vida entre los trypanosomas africanos	28
Figura 5 Transmisión cíclica y mecánica de los trypanosomas de la sección salivaria	29
Figura 6 Vías de transmisión posibles para <i>T. vivax</i>	31
Figura 7 Respuesta inmunitaria del ganado frente a <i>T. vivax</i>	34
Figura 8 Esquema de la metodología del CATT/ <i>T. evansi</i>	43
Figura 9 Niveles de aglutinación que se pueden obtener mediante la prueba CATT/ <i>T. evansi</i>	44
Figura 10 Esquema de la metodología del ELISAI	46
Figura 11 Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/ <i>T. evansi</i> en el bovino donante	48
Figura 12 Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/ <i>T. evansi</i> en el bovino control positivo.....	49
Figura 13 Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/ <i>T. evansi</i> en los bovinos controles negativos fuera del corral	50
Figura 14 Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/ <i>T. evansi</i> en los 3 bovinos tratados con cloruro de isometamidium (<i>Hemoveex</i> ®) con 1 dosis de 1mL/50 Kg. 51	51
Figura 15 Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/ <i>T. evansi</i> en los 3 bovinos tratados diaceturato de diminazeno (<i>Berenil</i> ®) con 2 dosis de 1mL/20Kg.....	52

Figura 16 Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/T. evansi en los 3 bovinos tratados dipropionato de imidocarb (Imidocarb®) con 1 dosis de 2.5 mL/100Kg....	53
Figura 17 Variación de IgG mediante ELISAI en el bovino donante.....	54
Figura 18 Variación de IgG mediante ELISAI en el bovino control positivo.....	55
Figura 19 Variación de IgG mediante ELISAI en el bovino control negativo dentro del corral	56
Figura 20 Variación de IgG mediante ELISAI en los bovinos controles negativos fuera del corral.....	57
Figura 21 Variación de IgG mediante ELISAI en los 3 bovinos tratados con cloruro de isometamidium (Hemoveex®) con 1 dosis de 1mL/50 Kg	58
Figura 22 Variación de IgG mediante ELISAI en los 3 bovinos tratados con diaceturato de diminazeno (Berenil®) con 2 dosis de 1mL/20Kg.....	59
Figura 23 Variación de IgG mediante ELISAI en los 3 bovinos tratados con dipropionato de imidocarb (Imidocarb®) con 1 dosis de 2.5 mL/100Kg	60

Abreviaturas

ABTS	2, 2' - azino - bis (ácido 3 - etilbenzotiazolin - 6 - sulfónico)
CATT	Prueba de aglutinación en tarjeta para trypanosomosis
ELISAI	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
IFAT	Prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes
DNA	Acido desoxirribonucleico
VSG	Glicoproteína de superficie variante
VAT	Antígeno de superficie variable
PBS	Tampón fosfato salino
OD	Densidad óptica
BSA	Albumina de suero bovino
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
RPP	Porcentaje relativo de positividad
DA	Diaceturato de diminazeno
ISM	Cloruro de isometamidium
IMD	Dipropionato de imidocarb

Resumen

La trypanosomosis bovina es una enfermedad hemoparasitaria causada por parásitos del género *Trypanosoma* y los más relevantes en América del Sur son *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax* ya que representan un riesgo potencial para la salud del ganado bovino. En Ecuador actualmente hay alrededor de 4,07 millones de cabeza de ganado de las cuales el 21,21% están en la provincia de Manabí. *Trypanosoma vivax* pertenece al grupo Salivaria lo que indica que se transmite a partir de la saliva del vector infectado, los bovinos infectados presentan anemia, fiebre, alteraciones reproductivas y nerviosas.

En el presente estudio se utilizó dos pruebas serológicas: ELISAI y aglutinación para evaluar la cinética de los anticuerpos IgG e IgM, respectivamente, en 11 bovinos experimentalmente infectados con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax*, y luego tratados con diacetato de diminazeno (DA) (n=3), dipropionato de imidocarb (IMD) (n=1) y cloruro de isometamidium (ISM) (n=3). Se comprobó que ambas pruebas serológicas permiten evaluar la cinética de IgG e IgM mediante la aplicación de las pruebas en el bovino donante que presentó altos niveles de los anticuerpos durante el tiempo de observación sin recibir tratamiento. La detección inicial de IgM en los animales infectados fue en el día 7 y día 11, debido a que es la inmunoglobulina de respuesta temprana y sus niveles de aglutinación descendieron al final de la observación (día 42) con los tratamientos ISM y DA. Se observó que los niveles de IgG variaban con respecto al tiempo, mostrando una oscilación representativa en bovinos infectados con *Trypanosoma vivax* que indica la eliminación inmunológica y la proliferación de poblaciones de trypanosomas. Ambas pruebas serológicas pueden dar falsos positivos debido a las reacciones cruzadas que *Trypanosoma vivax* puede presentar incluso entre especies taxonómicamente distantes.

Palabras clave: trypanosomosis, anticuerpos, ELISAI, CATT/T. *evansi*

Abstract

Bovine trypanosomosis is a hemoparasitic disease caused by parasites of the genus *Trypanosoma*, the most relevant in South America being *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) and *Trypanosoma vivax*, which represent a potential health risk for cattle. In Ecuador there are currently about 4.07 million head of cattle, 21.21% of which are in the province of Manabí. *Trypanosoma vivax* belongs to the Salivaria group, which indicates that it is transmitted from the saliva of the infected vector. Infected cattle show anemia, fever, reproductive and nervous disorders.

In the present study, two serological tests were used: ELISAI and agglutination to evaluate the kinetics of IgG and IgM antibodies, respectively, in 11 cattle experimentally infected with a native strain of *Trypanosoma vivax*, and then treated with diminazene diaceturate (DA) (n=3), imidocarb dipropionate (IMD) (n=1) and isometamidium chloride (ISM) (n=3). Both serological tests were found to evaluate the kinetics of IgG and IgM by applying the tests in the donor cattle that presented high levels of the antibodies during the observation time without receiving treatment. The initial detection of IgM in infected animals was on day 7 and day 11, because it is the early response immunoglobulin and its agglutination levels decreased at the end of the observation (day 42) with ISM and DA treatments. IgG levels were observed to vary with respect to time, showing a representative oscillation in *Trypanosoma vivax* -infected cattle indicating immunological elimination and proliferation of trypanosome populations. Both serological tests can give false positives due to the cross-reactions that *Trypanosoma vivax* can present even between taxonomically distant species.

Key words: trypanosomosis, antibodies, ELISAI, CATT/*T. evansi*.

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

De acuerdo a Desquesnes, el género *Trypanosoma* se ha propagado hacia el ganado de América del Sur durante el siglo XVI, debido a la llegada de ganado y caballos procedentes de África donde la trypanosomosis debida a *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*), *Trypanosoma equiperdum* (*T. equiperdum*), y *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*) era enzoótica (Desquesnes M., 2004). En 1929 en Martinica se reportó trypanosomosis bovina, atribuida a *T. vivax*, pero se presume que el parásito no pudo establecerse allí debido a la falta de vectores (Wells, 1970). Sin embargo, en Venezuela, Brasil, Argentina, Ecuador, Colombia y Perú *T. vivax* se estableció y actualmente se le considera como endémico (Fetene, Leta, Regassa, & Büscher, 2021).

En 1977 se realizó un reporte sobre la evidencia serológica de la distribución geográfica de *T. vivax* mediante la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) con ciertas modificaciones para Ecuador, se realizó el análisis de 310 muestras de suero, de las cuales se obtuvo una seroprevalencia de 22.5%, en Colombia de 48.2%. Paraguay 40% y en Brasil 54% (Wells, Betancourt, & Ramirez, 1977). A continuación en el 2014 se diseñó y optimizó un protocolo de PCR específico para *T. vivax* donde se muestreó 152 bovinos en un centro de faenamiento de Quito, mediante el cual se obtuvo una prevalencia del 30,26%, confirmando la presencia de *T. vivax* en el Ecuador (Ortega, Ron, Reyna, & Chavez, 2014).

En el 2017, ganaderos de Chone informaron sobre un posible caso de trypanosomosis que había causado la muerte de 600 reses, pero Agrocalidad menciona apenas 40, este reporte da el inicio para la investigación de la presencia de brotes de *T. vivax* en el país, un patógeno nuevo del que se conoce poco en la localidad (Vásconez, 2017).

En el 2021 gracias al reporte realizado a Agrocalidad por los ganaderos de Chone-Manabí en el 2017, se realizó el primer reporte e identificación molecular de *T. vivax* en ganado de Ecuador en donde 3 muestras de un total de 20 dieron positivo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en donde se amplificó un fragmento de catepsina L, confirmando así la presencia de *T. vivax* en el área (Chávez, et al., 2021).

T. vivax tiene la capacidad de evadir el sistema inmunológico del huésped persistiendo en los animales durante meses o años y gracias a que la complejidad antigénica del género *Trypanosoma* ha imposibilitado la fabricación de vacunas, es importante el desarrollo de herramientas diagnósticas altamente sensibles y específicas para la detección del parásito (Betancur, Jimenez, & Giraldo, 2016; Osório, et al., 2008).

Las pruebas diagnósticas más utilizadas para el diagnóstico de trypanosomosis bovina, son las pruebas serológicas IFAT y ELISA (acrónimo del inglés enzyme-linked immunosorbent assay) debido a sus costos accesibles y a su alta sensibilidad (Tamasaukas, Tamasaukas, Cobo, & Rivera, 2017). El desarrollo de una prueba ELISA para la detección de anticuerpos en ganado infectado con trypanosoma se dio en el año de 1977 y hasta la actualidad se siguen realizando investigaciones con modificaciones para cada cepa local ya que la sensibilidad y especificidad de género es alta, sin embargo la especificidad de especie suele ser baja por lo que se recomienda el uso de los antígenos y controles específicos (OIE, 2018).

Justificación del problema

En África subsahariana y África oriental la trypanosomosis animal se considera uno de los principales problemas de sanidad animal ya que el vector biológico se distribuye en 10 millones de Km^2 de tierras potenciales para pastoreo, exponiendo a aproximadamente 55 millones de personas y 160 millones de cabezas de ganado, dando una pérdida econó-

mica de 500 mil millones de dólares al año de forma directa e indirecta (Seyoum, Tora, Kore, & Lejebo, 2022).

Gracias a la adaptación de *T. vivax* a la transmisión mecánica ha podido llegar a América Central y del Sur (Sekoni, 1994). En Latinoamérica hace más de 40 años se demostró que las pérdidas económicas por *T. vivax* pueden ser cuantiosas, estimando una pérdida promedio de \$56.5 por cabeza de ganado en el caso de ganado lechero (Betancourt & Wells, 1979). Actualmente no se encuentran datos económicos sobre estudios realizados en Latinoamérica en general, pero sí en ciertos países.

T. vivax fue identificado por primera vez en el Pantanal brasileño en 1995 donde se encontró una infección en 7 ranchos con 2.222 vacas aproximadamente, las pérdidas debido al brote se estimaron en \$32.631 considerando que el brote fue tratado (Aguilar, et al., 1996). Debido a la interacción entre el Pantanal brasileño y las tierras bajas bolivianas en años posteriores se notificaron brotes en las tierras bajas bolivianas, entre ambas regiones se estima 11 millones de cabezas de ganado y extrapolando los resultados obtenidos del brote en el Pantanal brasileño se tendría una pérdida que supera los \$ 160 millones y de no ser tratado el brote las pérdidas serían de \$700 millones (Seidl, Dávila, & Silva, 1999).

Una evaluación económica más reciente se realizó en el año 2020 en Argentina, donde se realizó un estudio acerca de las pérdidas económicas ocasionadas por *T. vivax* y se indicó una pérdida de \$922,8 por cabeza de ganado en el caso de muerte y un promedio de \$58.802, en donde el principal componente son las pérdidas por producción, de un total de 220 cabezas de ganado (Abdala, Larriestra, & Signorini, 2020).

En el Ecuador no se reporta ningún estudio económico acerca del impacto de la trypanosomosis, sin embargo, la contribución económica del sector agropecuario al producto interno bruto (PIB) en el año 2020 fue del 8,25% y con un valor agregado bruto real de \$ 1.345.623 en el último trimestre del 2021, en base al censo nacional agropecuario realizado

en el año 2000, se conoce que más del 50% del ganado producido es ganado vacuno del cual se utilizan y exportan sus derivados, representando una entrada económica para el país y el sustento de cientos de familias (SIPA, 2021). El boletín técnico dado a conocer en el 2022 indicó que a nivel nacional en el periodo de 2021 existen 4,07 millones de cabezas de ganado y el 21% de este total se encuentra en la provincia de Manabí, por lo tanto, la trypanosomosis bovina tiene un importante impacto económico y de mejoramiento genético, ya que impide la introducción de especies reproductoras de otras áreas para de esta manera mejorar la producción (Suárez, et al., 2009; Orbe & Cuichán, 2022).

En Ecuador no hay un tratamiento para la trypanosomosis bovina, y al presentar signos clínicos no específicos es fácil de confundir por lo que un tratamiento y diagnóstico adecuado ayudan a eliminar el parásito y tener un mejor control de la enfermedad. El presente proyecto de investigación evaluará la cinética de anticuerpos IgG e IgM de bovinos tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium, contra una cepa nativa de *T. vivax* a través de la aplicación de pruebas serológicas ELISAI y aglutinación.

Las pruebas serológicas son de vital importancia para la detección de la infección a nivel de rebaños debido a su alta sensibilidad, especificidad y a sus bajos costos, sin embargo no permite discriminar a los animales infectados y a los curados después del tratamiento (Garcia, et al., 2021).

La cinética de los anticuerpos permite observar la tendencia de los anticuerpos frente a la infección en un tiempo determinado y puede servir como marcador en el desarrollo de vacunas (Shivam, EL-Matbouli, & Kumar, 2021). La inmunoglobulina M (IgM) es la más abundante durante la fase aguda de la infección, mientras que la inmunoglobulina G (IgG) se mantiene en niveles bajos, los cuales van aumentando conforme la infección avanza a la fase crónica (Murphy, et al., 2021).

La información obtenida busca apoyar el diagnóstico y desarrollar una estrategia de control de la trypanosomosis en el Ecuador, siendo una de las primeras que sigue esa línea de investigación en el país. La evaluación de la cinética de anticuerpos, post tratamiento, es un campo poco explorado y de gran utilidad para la evaluación diagnóstica, por lo que servirá como base para futuras investigaciones.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la cinética de anticuerpos IgG e IgM mediante pruebas serológicas ELISAI y aglutinación, en bovinos experimentalmente infectados con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax* y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium.

Objetivos específicos

- Aplicar las pruebas serológicas ELISAI y aglutinación para la detección de los anticuerpos IgG e IgM, respectivamente, en bovinos infectados experimentalmente con una cepa nativa de *Trypanosoma vivax*.
- Analizar los niveles del anticuerpo IgG mediante la prueba serológica ELISAI en bovinos infectados experimentalmente y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium para la evaluación de su cinética.
- Determinar el nivel de aglutinación del anticuerpo IgM mediante el kit comercial CATT/ *T. evansi* en bovinos infectados experimentalmente y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium para la evaluación de su cinética.

Hipótesis

La aplicación de pruebas serológicas ELISA y aglutinación permite evaluar la cinética de los anticuerpos IgG e IgM, respectivamente, en bovinos tratados con diacetato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium contra una cepa nativa de *Trypanosoma vivax*.

Capítulo II: Marco teórico

Trypanosomosis

La trypanosomosis animal es una enfermedad hemoparasitaria ocasionadas por parásitos del género *Trypanosoma*, se da en regiones tropicales de África, Asia y América del Sur, los trypanosomas más relevantes en para el ganado doméstico en África incluyen *Trypanosoma congolense* (*T. congolense*), *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) y *T. vivax*, mientras que en América del Sur son *T. evansi* y *T. vivax*, cabe mencionar que el ganado doméstico de importancia económica puede ser infectado por una o más de estas especies lo que se conoce como coinfección (Nok, 2009; Sellon, 2007). Estas dos especies, *T. evansi* y *T. vivax*, son las de mayor importancia económica en América del Sur ya que representan un riesgo potencial para alrededor de 300 millones de cabezas de ganado (Dávila & Silva, 2006).

División taxonómica

Los trypanosomas son organismos unicelulares que pertenecen al dominio Eucariota, al subfilo Sarcomastigophora que se caracteriza por la presencia de un único núcleo y el uso de flagelos o pseudópodos para la locomoción, al orden Kinetoplastida debido a la presencia de un cinetoplasto, a la familia Trypanosomatidae y al género *Trypanosoma* que se caracteriza por utilizar dos huéspedes, uno vertebrado y otro invertebrado, para completar su ciclo de vida (Giordani, Morrison, Rowan, De Koning, & Barrett, 2016; Kakundi, 2008).

Tabla 1*División taxonómica de T. vivax*

Taxonomía	
Dominio	Eucariota
Reino	Protista
Phylum	Protozoa
Subphylum	Sarcomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Genero	<i>Trypanosoma</i>

Es importante mencionar que el género *Trypanosoma* se agrupa en 2 secciones según el modo de transmisión por el insecto vector: Stercoraria y Salivaria, en la sección Stercoraria los trypanosomas se desarrollan en el tracto intestinal de su vector invertebrado y se transmiten a su huésped vertebrado mediante las heces ya que las formas meta cíclicas se desarrollan en los últimos tramos del tracto digestivo, está formada los subgéneros *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* y *Herpetosom*, la sección Salivaria agrupa los subgéneros *Nannomonas*, *Pycnomonas*, *Duttonella* y *Trypanozoon*, son aquellos que se transmiten mediante las picaduras cuando el vector muerde al huésped vertebrado para alimentarse de sangre ya que las formas meta cíclicas se desarrollan en las glándulas salivales del vector después de haber colonizado su estómago (García, et al., 2008; Baral T. N., 2010; Cayla, Rojas, Silvester, Venter, & Matthews, 2019).

Figura 1*Secciones del género Trypanosoma*

Phylum	Protozoa						
Order	Kinetoplastida						
Suborder	Trypanosomatina						
Family	Trypanosomatidae						
Genus	Trypanosoma						
Subgenus	Herpetosoma	Mega-trypanum	Schizo-trypanum	Duttonella	Nannomonas	Trypanozoon	Pycnomonas
Species	<i>T. theileri</i>	<i>T. rangeli</i> <i>T. lewisi</i> <i>T. muscoli</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. vivax</i> <i>T. uniforme</i>	<i>T. congolense</i> <i>T. simiae</i> <i>T. godfreyi</i>	<i>T. equiperdum</i> <i>T. evansi</i> <i>T. brucei</i>	<i>T. suis</i>
Subspecies		Stercoraria		Salivaria		<i>T.b. brucei</i> <i>T.b. rhodesiense</i> <i>T.b. gambiense</i>	

Nota. Adaptado de “Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions” (p. 4), por T. Baral, 2009, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010 (1)

Especies de Trypanosoma en bovinos

La mayoría de los trypanosomas patógenos del ganado son trypanosomas salivales que se transmiten por la picadura de un vector hematófago. En la Tabla 2 se resumen los trypanosomas que afectan al ganado en base a su patogenicidad (Desquesnes M., 2004).

Tabla 2

Especies de Trypanosoma que afectan al ganado bovino

Sección	Subgénero	Especie
Patogénicos	<i>Duttonella</i>	<i>T. vivax</i>
	<i>Trypanozoon</i>	<i>T. evansi</i>
Moderadamente patógeno	<i>Megatrypanum</i>	<i>T. theileri</i>
	<i>Megatrypanum</i>	<i>T. ingens</i>
	<i>Megatrypanum</i>	<i>T. melophagium</i>

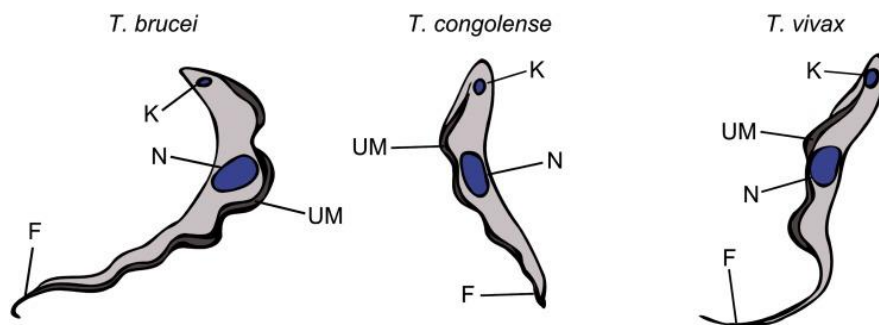
Sección	Subgénero	Especie
Otros	<i>Schizotrypanum</i>	<i>T. cruzi</i>
	<i>Megatrypanum</i>	<i>T. mazamarum</i>

Trypanosoma vivax

T. vivax es un parásito protozoario, que puede tener un ancho de 3 μm y una longitud de 18 a 31 μm , incluido el flagelo libre que puede medir entre 3 a 6 μm , posee una membrana ondulada de desarrollo medio y un gran cinetoplasto terminal situado en la extremidad posterior (Figura 2). Está agrupado en la sección Salivaria, es decir que se transmite a partir de la saliva del vector infectado (Giordani, Morrison, Rowan, De Koning, & Barrett, 2016; Osório, et al., 2008).

Figura 2

Comparación morfológica de *T. vivax*, *T. congolense* y *T. brucei*



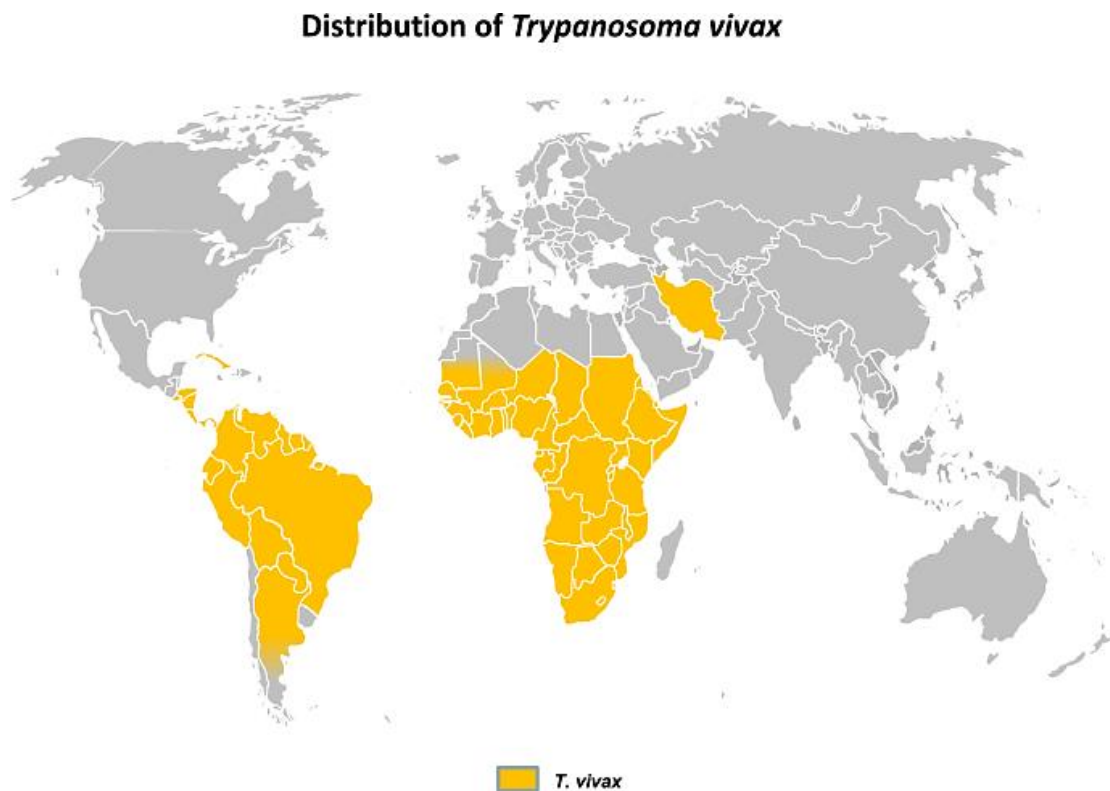
T. vivax tiene 18-26 de longitud; extremo posterior redondeado; núcleo (N) central; membrana ondulante modesta (UM); flagelo libre en el extremo anterior (F); cinetoplasto grande terminal; esencialmente monomórfico.

Nota. Adaptado de "The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review" (p. 1863), por Giordani, et al., 2016, *Parasitology*, 143 (14)

T. vivax se transmite de forma cíclica y mecánica por lo que este parásito ha logrado distribuirse en África, en zonas que están libres de la mosca tse-tsé, en América Central, América del Sur y actualmente también en Irán (Desquesnes, et al., 2022). En Irán se realizó la primera identificación de *T. vivax* en camellos, mediante microscopía y exámenes moleculares de los cuales se obtuvo una prevalencia del 11,94% confirmando la presencia de *T. vivax* en Irán y demostrando que puede haber una propagación a nivel mundial de este parásito (Asghar & Rassouli, 2022).

Figura 3

Distribución de T. vivax a nivel mundial



Nota. Tomado de “A review on the diagnosis of animal trypanosomoses” (p. 4), por M. Desquesnes, et al., 2022, *Parasites & Vectors* 15 (64)

La patogenicidad se describe como la capacidad del agente infeccioso de causar daño en su hospedador, se considera que las cepas de África occidental son más patóge-

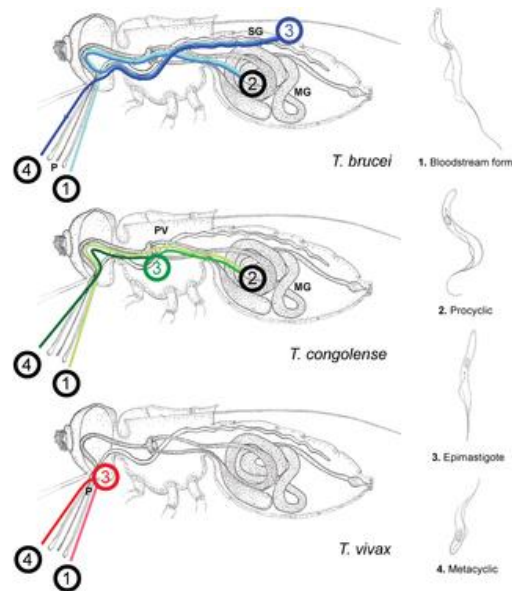
nas para el ganado, mientras que las cepas de Latinoamérica generan infecciones crónicas y leves (Osório, et al., 2008; Gardiner, 1989). En una infección experimental realizada en ovejas con dos cepas de *T. vivax* se observó que la cepa TvLIEM176 presentó una moderada patogenicidad y una virulencia alta, sin embargo la cepa TvMT1 presentó una alta patogenicidad y una baja virulencia, en el estudio se menciona que las diferencias de patogenicidad y virulencia pueden ser debido a las diferencias encontradas en sus proteomas (Ramirez, et al., 2019).

T. vivax se hospeda tanto animales silvestres como domésticos, siendo el ganado bovino la especie más estudiada debido a su importancia económica, entre los animales domésticos que infecta se encuentran ovejas, cabras, bovinos, cerdos, perros, burros, caballos, dromedarios y búfalos domésticos, cabe recalcar que los datos acerca de especies silvestres se deben manejar con cautela ya que incluso las pruebas moleculares pueden tener limitaciones y que las infecciones encontradas sean de otra especie de trypanosoma (Fetene, Leta, Regassa, & Büscher, 2021).

Ciclo de vida

Figura 4

Variación del ciclo de vida entre los trypanosomas africanos



Nota. Tomado de "Perfil global de expresión génica a través del ciclo de vida completo de *Trypanosoma vivax*" (p. 3), por A. Jackson et al., 2015, *Plos Neglected Tropical Diseases* 9 (8)

T. vivax se diferencia de otros trypanosomas del grupo Salivaria como *T. congolense* y *T. brucei*, ya que carece de una etapa procíclica en el intestino medio del insecto vector y se desarrolla directamente en forma de epimastigote dentro de la probóscide del insecto (Jackson, et al., 2015). En las áreas donde no hay mosca tse-tsé *T. vivax* se transmite de forma mecánica, donde el parásito no se desarrolla ni se multiplica en el insecto vector y se transmite mediante el vector que se puede alimentar de más de un animal, de esta manera, infecta a varios animales, la infección inicia en el huésped vertebrado cuando la mosca vector inyecta al parásito en su forma infectiva conocida como tripomastigotes metacíclicos los cuales se desarrollan y multiplican en el sitio de infección para que los trypanosomas san-

guíneos maduros conocidos como tripomastigotes se liberen a la circulación sanguínea mediante los vasos y ganglios linfáticos (Dagnachew & Bezie, 2015).

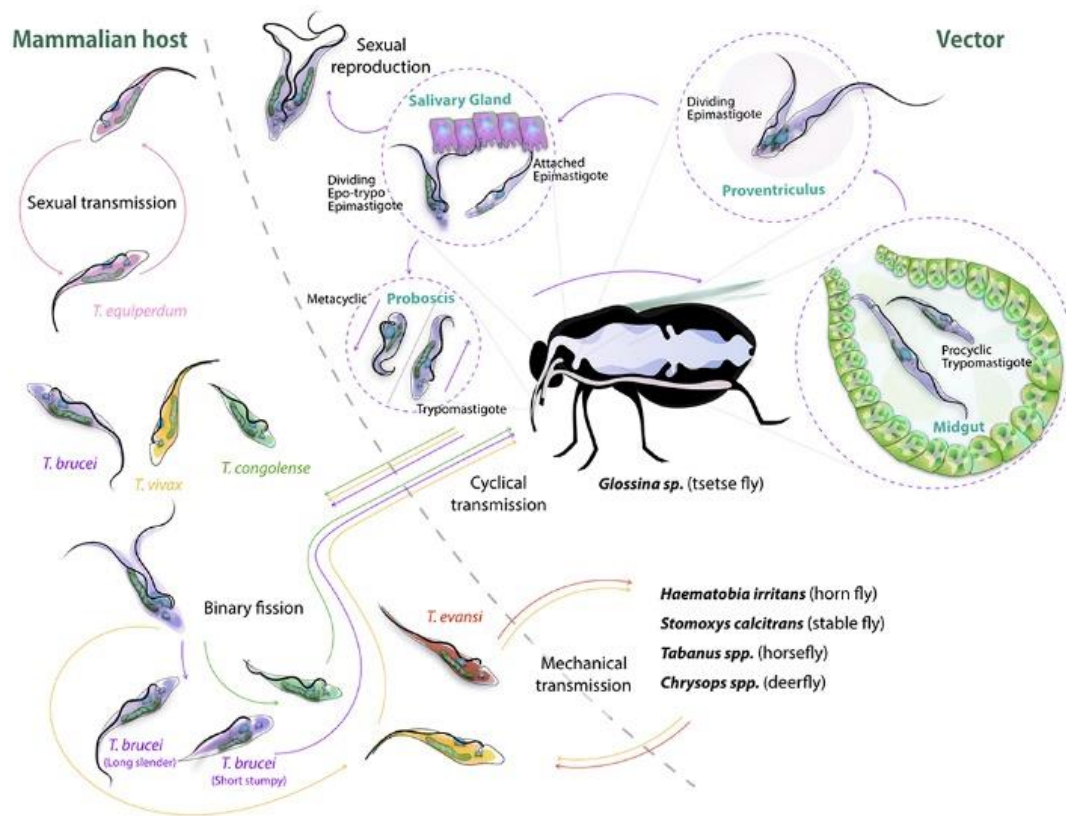
En el huésped vertebrado la reproducción se da por fisión binaria por lo tanto la forma del parásito es heterogénea en el torrente sanguíneo, teniendo la fase delgada proliferativa conocida como slender y la forma achaparrada no proliferativa conocida como stumpy durante el pico de la parasitemia (Baral T. N., 2010).

Transmisión en América del Sur

Transmisión mecánica. Es la principal vía de transmisión en América y en algunas otras partes del mundo, donde sus principales vectores son: la mosca tábano, la mosca de los establos y la mosca de los cuernos (Radwanska, Vereecke, Deleeuw, Pinto, & Magez, 2018). La transmisión inicia a través de la boca contaminada de los insectos u otros animales que se alimentan de sangre como el murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*), la boca contiene parásitos vivos en forma de torrente sanguíneo, tripomastigotes, que cambian rápidamente de huéspedes permitiendo la transferencia inmediata sin formas intermedias para que se logre la transmisión mecánica se deben cumplir una alta parasitemia en los portadores, abundancia de vectores y disponibilidad de receptores, por lo tanto, su probabilidad es relativamente baja, cuando se cumplen estas condiciones, la incidencia de infecciones de transmisión mecánica es mayor al 70% (Boulanger, 2018; Osório et al., 2008).

Figura 5

Transmisión cíclica y mecánica de los trypanosomas de la sección salivaria



Nota. Adaptado de “Salivarian trypanosomosis: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction with the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System” (p. 7), por M. Radwanska et al., 2018, *Frontiers in Immunology* 9 (1)

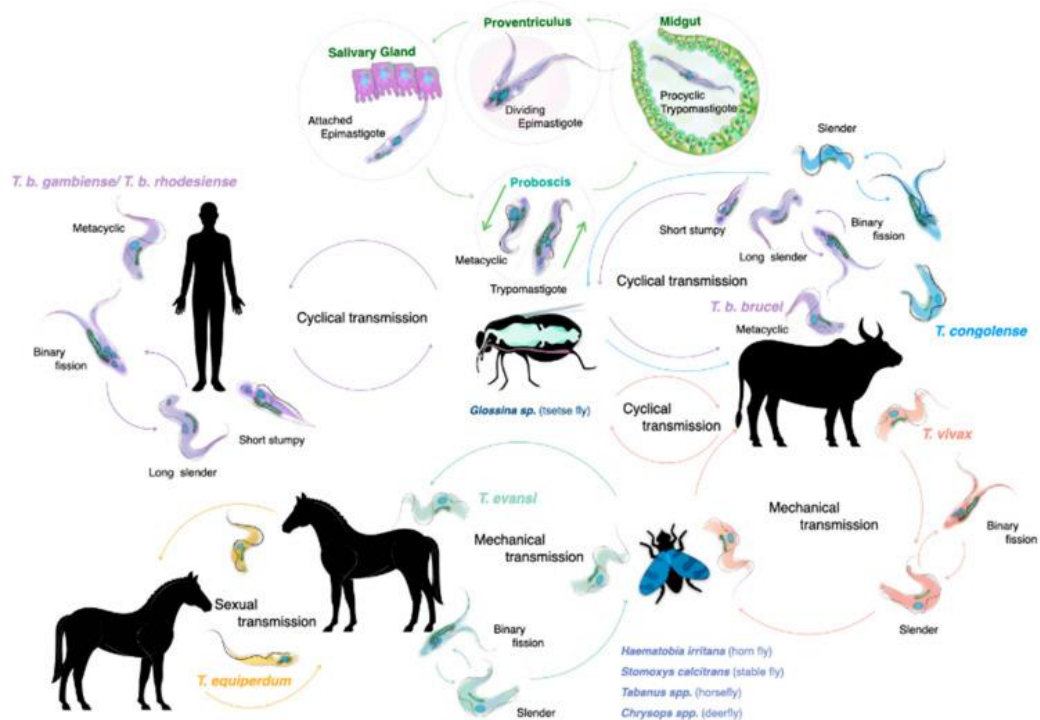
Vía iatrogénica. Es un tipo de transmisión mecánica que se da mediante el uso de instrumentos quirúrgicos, agujas y jeringas infectadas (Dvm & Rovid, 2018). Un estudio realizado para conocer cuántos bovinos se infectan con *T. vivax* usando la misma aguja y jeringa por diferentes vías, indicó que de un total de cada 20 bovinos se infectan 15 por vía intravenosa, 9 por vía intramuscular y 3 por vía subcutánea confirmando así la vía iatrogénica como un medio de transmisión (Dias, et al., 2022).

Se necesita más información para saber si *T. vivax* se transmite por vía sexual, hasta el momento un estudio realizado con una infección experimental demostró que se detectó DNA en el semen de 5 de los 8 bovinos infectados experimentalmente, además de que el

esperma tenía menor turbulencia, menor vigor y más anomalías que el grupo control (Monteiro, et al., 2022).

Figura 6

Vías de transmisión posibles para *T. vivax*



Nota. Adaptado de “Salivarian Trypanosomes Have Adopted Intricate Host-Pathogen Interaction Mechanisms That Ensure Survival in Plain Sight of the Adaptive Immune System” (p. 4), por S. Magez et al., 2021, *Pathogens* 10 (6)

Vectores

En África la trypanosomosis se transmite por mordeduras del vector biológico, la mosca tse-tsé. Sin embargo, en América del Sur que se encuentra libre de mosca tse-tsé, se transmite de forma mecánica por otras especies de moscas hematófagas entre las que se encuentran los géneros *Stomoxys*, *Haematobia*, *Hippobosca* y especialmente el género *Tabanus* (Eloi, et al., 2017).

Stomoxys. El principal representante de este género es la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) llega a medir de 7 a 8 *mm*, es similar a una mosca doméstica con la diferencia de que su probóscide es prominente, similar a la mosca tse-tsé. Estas moscas pueden cambiar de huésped durante una sola comida y tanto el macho como la hembra se alimentan de sangre (Anziani, 2010).

Haematobia. La mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) mide de 3 a 5 *mm*, es una de las principales plagas para el ganado de pastoreo, ambos sexos se alimentan de sangre y generalmente se ubican en la parte del lomo, presentan una mordedura fuerte gracias a su probóscide y se alimentan varias veces al día (Boxler, 2015).

Hippobosca. Son conocidas como moscas piojo debido a que sus alas son pequeñas y atrofiadas por lo que tienen apariencia de un piojo. El macho y la hembra son insectos picadores (Desquesnes M, 2004).

Tabanus. Son los hematófagos más importantes ya que han propagado la trypanosomosis en Centroamérica, Sudamérica y el Caribe, su tamaño varía de 6 a 30 *mm*. Los machos se alimentan de néctar y polen, mientras que las hembras se alimentan de sangre gracias a que poseen un aparato bucal picador (INTA EEA, 2012).

Síntomas

Se ha observado que *T. vivax* varía los signos clínicos y la gravedad de la enfermedad dependiendo de la raza de ganado, las cepas y la ubicación geográfica. En África Oriental los rumiantes salvajes permanecen asintomáticos siendo los reservorios, mientras que las especies de ganado desarrollan cambios patológicos (Rodrigues, et al., 2017).

Los bovinos parasitados presentan anemia, fiebre persistente, fotofobia, lagrimeo, inapetencia, debilidad, abortos, mortalidad perinatal, efectos degenerativos a nivel testicular y epididimario y en ocasiones puede causar hasta la muerte. Al momento de la autopsia los

órganos se observan con leucopenia, trombocitopenia, lesiones degenerativas e inflamatorias (Osório et al., 2008). Las alteraciones reproductivas pueden conducir a problemas de infertilidad temporal y en algunos casos hasta la esterilidad (Betancur, Jimenez, & Giraldo, 2016).

Respuesta inmunitaria

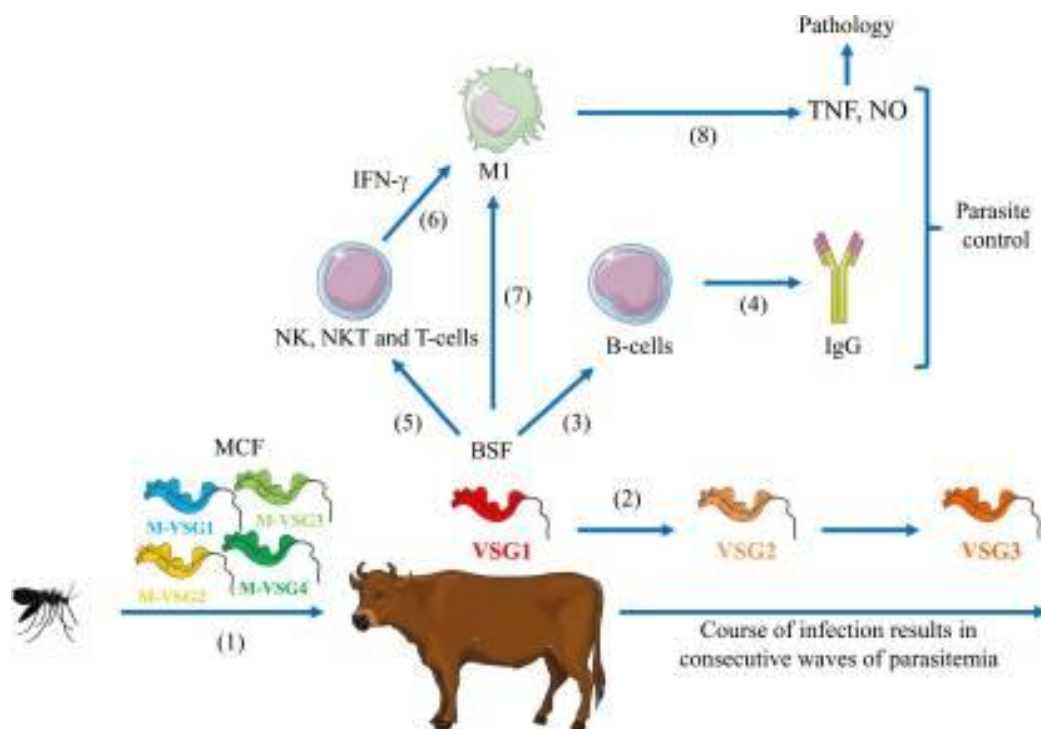
Una vez que los parásitos presentes en la saliva ingresan se enfrentan a la respuesta inmune humoral del huésped, para evadir esta respuesta los parásitos están cubiertos de una densa capa de glicoproteína superficial variante (VSG) que los protege. A continuación, para escapar de la eliminación mediada por células B, que es la primera línea de defensa, los parásitos adquieren un sistema de variación antigénica que les permite cambiar su capa a un tipo de antígeno variable diferente y, además presentan una alta tasa de endocitosis, que consiste en eliminar las moléculas de VSG unidas al anticuerpo (Magez, Pinto, Obishakin, & Radwanska, 2020).

Los componentes parasitarios desencadenan la activación de NK, NKT, células T que producen IFN- γ , las células B y la producción de IgG. Los componentes parasitarios junto con IFN- γ desencadenan la inducción de macrófagos activados que desarrollan una respuesta inmune inflamatoria de tipo 1 (Th1) tras la exposición a moléculas derivadas de parásitos. La persistencia de Th1 y los macrófagos hiperactivados provocan animales tripanosusceptibles que desarrollan el síndrome de respuesta inmunitaria sistémica y la anemia, mientras que, los animales tripanotolerantes pueden cambiar a una respuesta inmune tipo 2 (Th2) y la inducción de macrófagos activados alternativamente. La inmunosupresión es una característica muy documentada y resulta en una disminución de la población linfocitaria y una respuesta deprimida de las células T, B y la secreción de citocinas (Ramírez, et al., 2015).

En un estudio realizado se sugirió que el ganado que se encuentra en un área donde la enfermedad es endémica y es repetidamente infectado con trypanosomas de diferentes especies demuestra una alta Th1, mientras que el ganado en un área no endémica con infecciones crónicas de *T. theileri* muestra una alta Th2 (Bakari et al., 2017).

Figura 7

Respuesta inmunitaria del ganado frente a T. vivax



Nota. Adaptado de "African Trypanosomes Undermine Humoral Responses and Vaccine Development: Link with Inflammatory Responses" (p. 4), por B. Stijlemans et al., 2017, *Frontiers in Immunology* 8(1)

Los niveles elevados de anticuerpos se han descrito como un mecanismo eficaz para el control de la parasitemia. Describieron que durante las etapas de prepatente, patente y postratamiento se han observado altos niveles de IgM e IgG (Boeira, et al., 2018).

Diagnóstico

Es importante para el manejo y control de la enfermedad, *T. vivax* desencadena síntomas inespecíficos por lo que es importante que los métodos de diagnóstico sean sencillos, rápidos y de alta sensibilidad y especificidad (Batista, et al., 2007).

Los métodos más comunes son los parasitológicos, serológicos y moleculares. El diagnóstico parasitológico presenta una alta especificidad, pero su sensibilidad es muy baja. Las técnicas serológicas son más sensibles que las técnicas moleculares y se recomienda utilizarlas para la búsqueda de animales que permanezcan infectados después del tratamiento (Fidelis et al., 2019; Hailu, Endale, & Gemed, 2019).

Técnicas serológicas. El diagnóstico serológico depende principalmente de la reacción antígeno-anticuerpo. Las pruebas más importantes son la prueba de aglutinación en tarjeta para trypanosomosis (CATT), la prueba de anticuerpos inmunofluorescentes indirectos (IFAT) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Boulangé, et al., 2017). Las ventajas de las pruebas serológicas es que se pueden utilizar para el diagnóstico de rebaños enteros sin la necesidad de equipos costosos y que poseen una alta sensibilidad gracias a la estandarización de la producción de antígenos solubles, las desventajas es la incapacidad de diferenciar la infección actual de la anterior y que los antígenos son compartidos por varios trypanosomas por lo tanto la prueba no es específica (Desquesnes M., 2004; Hailu, Endale, & Gemed, 2019).

Se espera que en futuro se pueda utilizar los extractos totales de los parásitos para la producción del antígeno soluble y de esta manera mejorar la especificidad de las pruebas serológicas y permitir la detección de anticuerpos específicos (OIE, 2018).

Una alternativa sugerida para aumentar la especificidad de las técnicas serológicas es el uso de proteínas recombinantes. En un ELISA anti - *T. vivax* IgG se utilizó la proteína

recombinante MyxoTLm como antígeno, esta proteína recombinante proviene de una proteína altamente conservada. Los resultados revelaron una especificidad del 95,65 % y una sensibilidad del 88,23 % confirmando que MyxoTLm aumenta la sensibilidad y la especificidad en comparación con los antígenos preparados con extractos solubles crudos, de los cuales se obtuvo una sensibilidad del 82,35 % y una especificidad de 69,56 % (Gomide, et al., 2021).

IFAT. En esta prueba, los frotis de sangre de animales infectados se fijan y se utilizan como fuente de antígenos para que los anticuerpos presentes en los sueros se puedan unir. Los anticuerpos unidos se visualizan usando un anticuerpo secundario anti-especie huésped conjugada a un tinte fluorescente usando un microscopio fluorescente (Hailu, Endale, & Gemed, 2019).

Fidelis et al. (2019) realizaron un estudio donde se compararon las técnicas de diagnóstico en animales infectados experimentalmente. Para las técnicas utilizaron los antígenos obtenidos de una cabra infectada experimentalmente con *T. vivax*, utilizando el aislado "Lins". La técnica ELISA detectó una seropositividad en 49 de las 54 muestras positivas conocidas, mientras que la técnica IFAT, detectó una seropositividad en 51 de las 54 muestras positivas conocidas. La técnica IFAT demostró ser ligeramente más sensible, pero, ambas pruebas a pesar de ser altamente sensibles solo demuestran la exposición al agente infeccioso, no indican si la infección permanece activa.

ELISA. Es un inmunoensayo que se utiliza para detectar y cuantificar anticuerpos, antígenos y otras proteínas. Hay varios tipos de ELISA, pero los más utilizados son el ELISA directo que es el más rápido, pero tiene una baja sensibilidad y alto costo, el ELISA indirecto que tiene una alta sensibilidad, es menos costoso y más flexible, pero hay el riesgo de reactividad cruzada, el ELISA Sándwich que tiene la mayor sensibilidad entre todos los tipos de ELISA, pero tiene un mayor costo y requiere mayor tiempo y el ELISA competitivo que

puede detectar una amplia gama de antígenos, pero tiene baja especificidad y no se puede utilizar en muestras diluidas (Alhajj & Farhana, 2022). La forma más utilizada para la detección de inmunoglobulinas G (IgG) en bovinos es el ELISAI, que tiene una sensibilidad sobre el 90%. Para la especificidad de especie se debe considerar la reacción cruzada entre *T. vivax*, *T. evansi* y *T. cruzi*

Benfodil et al. (2020) realizaron un estudio en 754 animales domésticos que fueron analizados para *T. evansi* con 6 pruebas diferentes, entre las cuales se incluía dos ELISAI, el primero que utilizó como antígeno VSG RoTat 1.2 y el segundo que utilizó como antígeno el lisado de las células completas de *T. evansi*. El análisis de clases latentes mostró que ambos ELISAI fueron 100 % sensibles y altamente específicos, para el primero se obtuvo una sensibilidad promedio del 97% mientras que, para el segundo fue del 99%.

Prueba de aglutinación en tarjeta. Su objetivo es evaluar la presencia de anticuerpos en una muestra. Se fundamenta en las reacciones de aglutinación directa que se producen cuando el suero del animal presenta anticuerpos, frente al antígeno, y al entrar en contacto con el mismo, da lugar al complejo antígeno- anticuerpo formando agregados visibles que se interpretan como positivos (Inojosa, et al., 2006; Rodrigues, et al., 2017)

Actualmente, la prueba de aglutinación en tarjeta para *T. evansi* (CATT/ *T. evansi*) es la prueba de aglutinación, en suero, de referencia recomendada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para la detección de IgM de *T. evansi*. Aunque la prueba se desarrolló para *T. evansi* también se utiliza para detectar IgM de *T. vivax* debido a la alta reactividad cruzada antigénica (Desquesnes M. , Compendium of Diagnostic Protocols of the OIE Reference Laboratory for Animal Trypanosomoses of African Origin, 2017).

En estudios se utiliza CATT/ *T. evansi* como estándar de oro, para comparar otras pruebas de aglutinación debido a su bajo porcentaje de falsos positivos y a que se asocia la

alta especificidad y sensibilidad a su capacidad para detectar anticuerpos frente al antígeno de superficie variable (VAT) tipo RoTat1.2 (Reck, Menin, Batista, Oliveira, & Miletto, 2021).

Tratamiento

El tratamiento satisfactorio de la trypanosomosis requiere algo más que un fármaco tripanocida administrado correctamente. Los animales bien descansados y alimentados se recuperan más rápidamente después de la terapia tripanocida que los animales desnutridos que tienen que caminar largas distancias para llegar a los pastos y al agua. Sin embargo, la trypanosomosis crónica a menudo no responde a la terapia y las alteraciones ferrocinéticas y la dishemopoyesis ya que pueden ser irreversibles (Osório et al., 2008).

Los fármacos considerados en el tratamiento para por *T. vivax* son:

Diaceturato de diminazeno (DA). Se ha reportado que tienen efectos quimioterapéuticos en las trypanosomosis de los caballos. Se administra por vía intramuscular, la eficacia depende de la sensibilidad de los microorganismos a los principios activos y la dosis depende del peso corporal (Boeira, et al., 2018).

Cloruro de isometamidium (ISM). Se introdujo en la década de 1960 y es el único fármaco etiquetado para la profilaxis de trypanosomosis animal africana. Se administra por vía intramuscular con dosis dependiente del peso corporal (Richards, et al., 2021).

Dipropionato de imidocarb (IMD). Es un derivado de carbanilida utilizado para tratar infecciones causadas por protozoos. Es comúnmente utilizado para tratar infecciones por *Babesia spp*, *Hepatozoon canis*, *T. brucei*, *Ehrlichia canis*, *Rickettsia* y *Anaplasma* (Duszynski, Kvičerová, & Seville, 2018).

En un estudio realizado para observar la resistencia de ISM y DA se utilizaron 24 bovinos (*Bos indicus*), los cuales se dividieron en 4 grupos. Los 2 primeros grupos fueron

infectados con *T. vivax* aislado de una zona infestada de mosca tse-tsé, se trataron con ISM (0.5 mg/Kg) y DA (3.5 mg/Kg) por separado. En los 2 últimos grupos se realizó el mismo tratamiento, con la diferencia de que la infección se realizó con *T. vivax* aislado de una zona no infestada de mosca tse-tsé. Los resultados demostraron una recaída de un total de 9 animales entre los 4 grupos, en un periodo de 37 días post- tratamiento. Este número representa más del 20% del grupo de estudio inicial por lo que se concluye la presencia de parásitos resistentes (Dagnachew, et al., 2015b).

Estudios más recientes han evaluado la eficacia terapéutica de DA, IMD e ISM en el cual se observó que 2 tratamientos de los 5 aplicados tuvieron el 100% de eficacia. De estos 2 grupos, el primero se trató con ISM (1.0 mg/Kg) y el segundo se trató con DA (7.0 mg/Kg) en el día 0 e ISM (1.0 mg/Kg) en el día 14. En tratamiento con IMD (4.8 mg/Kg) los animales recayeron, volviendo a presentar altas parasitemias, esto coincide con estudios previos que mencionan la baja eficacia de este fármaco. DA dio buenos resultados, pero no pudo prevenir la segunda infección, por lo que su corta vida media se considera una desventaja. En conclusión, ISM es el mejor fármaco para tratar trypanosomosis en concentraciones mayor o iguales a 1.0 mg/Kg lastimosamente en la actualidad no está disponible en el mercado (Azeredo, et al., 2020).

Capítulo III: Materiales y métodos

Participantes

El presente trabajo de titulación fue elaborado por la señorita Joselyn Andrea Espinosa Tenorio, egresada de la carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la tutoría de la Dra. María Augusta Chávez Larrea, M. Sc. docente-investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, la asesoría del Dr. Armando Reyna Bello, PhD., docente-investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas, del Dr. Jorge Ron Román, PhD., docente-investigador de la Universidad de las

Fuerzas Armadas ESPE sede IASA y la Ing. Cristina Cholota Técnico del laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal.

Zona de estudio

El presente trabajo de titulación se realizó el laboratorio de Sanidad Animal y Mejoramiento Genético de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede IASA ubicada en la hacienda El Prado, en el sector de San Fernando y en el laboratorio de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo de los Tsáchilas ubicada en el kilómetro 24 de la Vía Santo Domingo – Quevedo, en la hacienda Zoila Luz y en el laboratorio de Sanidad Animal y Mejoramiento Genético de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede IASA ubicada en la hacienda El Prado, en el sector de San Fernando.

Duración de la investigación

El presente trabajo de titulación inició en febrero del 2022 y culminó en febrero del 2023.

Unidades de estudio

En este estudio se utilizó 15 bovinos machos de raza *Bos taurus* de los cuales: 1 animal, al que se lo describe en todo el estudio como donante, fue inoculado con una cepa nativa aislada criopreservada de *T. vivax* proporcionada por el laboratorio interdisciplinario de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, como parte 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 trypanosomosis en Ecuador (BruTryp)” financiado por la ARES de Bélgica.

Una vez que la parasitemia del donante llegó a ser superior a $10^5 - 10^6$, donó sangre de la vena yugular para inocular con un millón de trypanosomas en 0.2mL de sangre a 10 de los 14 bovinos restantes.

Los 15 bovinos formaron diferentes unidades de estudio para su seguimiento serológico: 1 bovino donante, 1 bovino control positivo, 1 bovino control negativo dentro del corral, 1 grupo control negativo fuera del corral (n=3) y 3 grupos experimentales, cada uno con un fármaco diferente.

Los animales pertenecientes a los grupos de tratamiento farmacológico a los 10 días post infección fueron tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium como se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3

Organización de las unidades de estudio

Infección	Grupo	Número de animales	Dosis	Fármaco
Sí	Donante	1	-	-
Sí	Control positivo	1	-	-
No	Control negativo dentro del corral	1	-	-
No	Control negativo fuera del corral	3	-	-
Sí	Grupo 1	3	$\frac{1mL}{20Kg}$	DA (Berenil®)
Sí	Grupo 2	3	$\frac{2.5mL}{100Kg}$	IMD (Imidocarb®)
Sí	Grupo 3	3	$\frac{1mL}{50Kg}$	ISM (Hemo-veex®)

Trabajo de campo

Obtención de muestras sanguíneas de bovinos

La extracción de sangre se realizó de la vena yugular en tubos sin anticoagulante para la obtención del suero. Los terneros se colocaron en posición decúbito lateral, se desinfectó de adentro hacia afuera el área de punción, la vena se palpó con los dedos índice y medio y se insertó la aguja con el bisel hacia arriba formando un ángulo de 45°.

Trabajo de laboratorio

Procesamiento de muestras sanguíneas

Para la obtención de los sueros, las muestras de sangre sin anticoagulante fueron incubadas durante 1 hora y posteriormente centrifugadas durante 15 minutos a 4000 rpm. El suero se extrajo con micropipeta, se colocó y se preservó en tubos de 2mL de tapa rosca a -20°C

Detección de anticuerpos IgM mediante el kit comercial CATT/T. evansi

Para la detección de IgM se utilizó la prueba de aglutinación en tarjeta para trypanosomosis (CATT), el kit CATT/T. *evansi* fue adquirido del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica, el que incluyó material y reactivos descritos a continuación.

Reactivos. Los reactivos incluidos en el kit se describen en la tabla 4.

Tabla 4

Tabla de reactivos del kit comercial CATT/T. evansi

Reactivo	Viales	Volumen (mL/vial)
Antígeno CATT	6	2.5

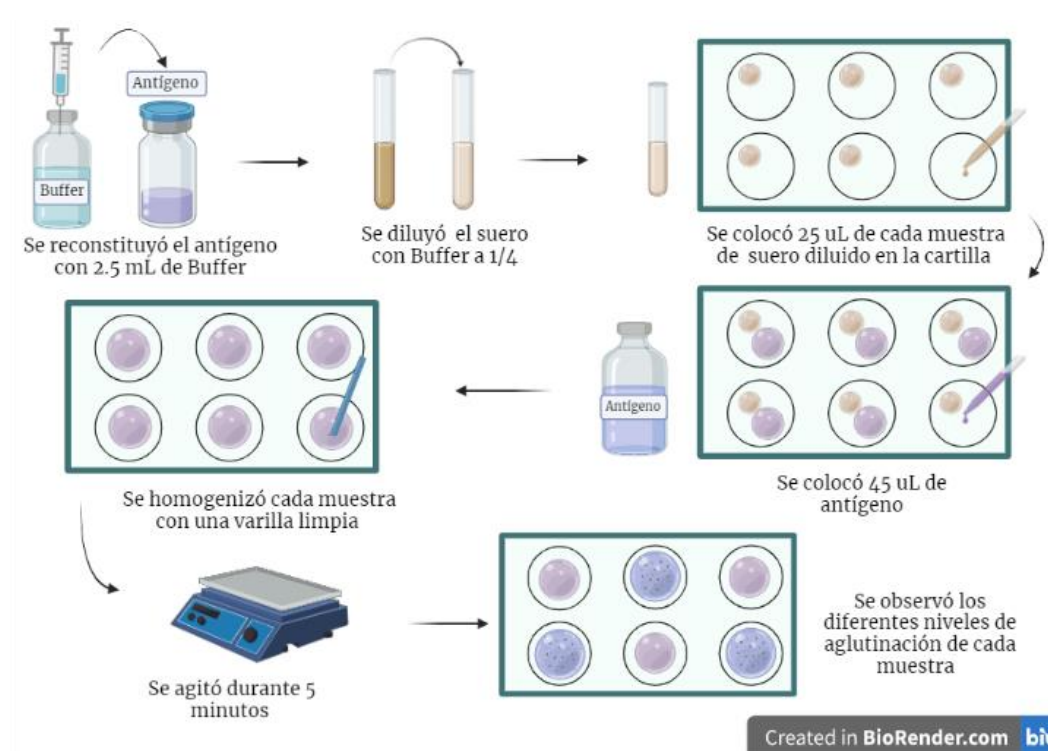
Reactivo	Viales	Volumen (mL/vial)
Buffer CATT	1	30
Control positivo	1	0.5
Control negativo	1	0.5

Materiales. El kit adquirido incluyó: cartillas de cartón revestidas de plástico como soporte, varillas para homogenizar las mezclas de suero-antígeno y goteros.

Procedimiento. Se preparó diluciones $\frac{1}{4}$ de los sueros con el Buffer CAAT, con una micropipeta se tomó $25 \mu\text{L}$ del suero diluido y se colocó en la cartilla junto con $45 \mu\text{L}$ del antígeno CATT. Con la ayuda de las varillas se homogenizó el suero con el antígeno y finalmente se agitó la cartilla con movimientos circulares de izquierda a derecha durante 5 minutos.

Figura 8

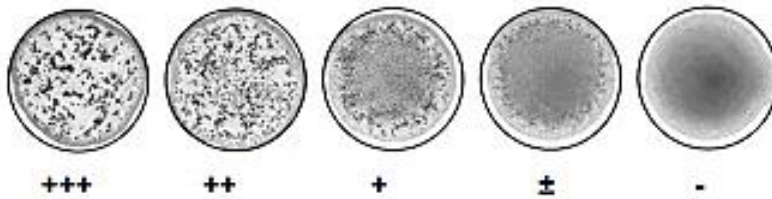
Esquema de la metodología del CATT/*T. evansi*



Interpretación de resultados. Los resultados se interpretaron cualitativamente en base a cruces, dependiendo del nivel de aglutinación, como se muestra en la figura 11, del suero sanguíneo analizado.

Figura 9

Niveles de aglutinación que se pueden obtener mediante la prueba CATT/T. evansi



Nota: Los niveles de aglutinación se interpretan de la siguiente forma **+++**: Positivo fuerte (Aglutinación muy fuerte), **++**: Positivo (Aglutinación fuerte), **+**: Positivo (Aglutinación moderada), **±**: Positivo débil (Aglutinación débil), **-**: Negativo (Ausencia de aglutinación). Adaptado de "CATT/*T. evansi* (*) Serodiagnosis of animal trypanosomiasis due to *T. evansi* (Surra)" (p. 2), por Institute of Tropical Medicine, 2017.

Detección de anticuerpos IgG mediante la prueba ELISAI

Para la detección de IgG se utilizó el antígeno y los controles adquiridos del Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD, por sus siglas en francés).

Preparación de buffers. Las soluciones y concentraciones utilizadas para todo el ensayo se describen a continuación en la tabla 5

Tabla 5

*Soluciones utilizadas en la prueba ELISAI para *T. vivax**

Solución	Reactivos	Concentración	pH
Buffer Carbonato-Bicarbonato	Carbonato de sodio Na_2CO_3 y Bicarbonato de sodio $NaHCO_3$.	50 Mm	9.6
Buffer Citrato	Ácido cítrico monohidratado	2%	4
PBS	-	1X	7.4
BSA-T	BSA + WB	4%	
Buffer de Lavado (WB)	PBS + Tween-20	0.1%	
Buffer de Bloqueo	PBS + leche en polvo descremada	5%	
ABTS	ABTS + agua destilada	2%	
Peróxido de hidrogeno	Peróxido de hidrogeno + agua destilada		

Equipo. El equipo que se utilizó para la aplicación del ELISAi fue una incubadora, pH metro, balanza analítica, vortex, lector de placas y pipeta multicanal.

Procedimiento. Se aplicó el protocolo descrito en el Compendio de Protocolos Estándar de Diagnóstico para trypanosomosis Animal de Origen Africano de la Organización

Internacional de Epizootias (OIE), actualmente conocida como Organización Mundial de la sanidad Animal (OMSA)

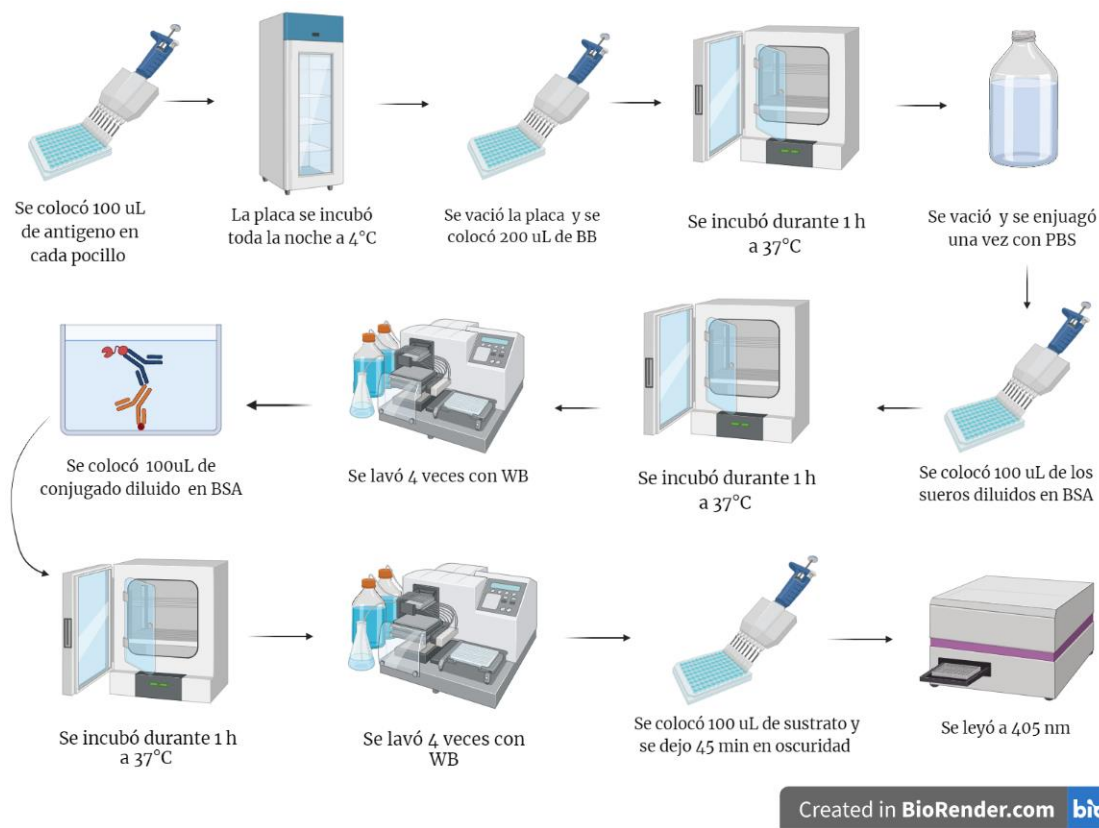
Tabla 6

Protocolo de la prueba ELISAI para la detección de IgG de T. vivax

Etapa	Concentración	Buffer	Volumen por pocillo	Incubación
Sensibilización	$5 \frac{\mu g}{mL}$	Carbonato 50Mm	100 μ L	Toda la noche a 4°C
Bloqueo	5%	Buffer de Bloqueo	200 μ L	1h a 37°C
Enjuague		1 vez con PBS		
Anticuerpo primario	1/100	BSA-T	100 μ L	1h a 37°C
Lavado		4 veces con Buffer de Lavado		
Anticuerpo secundario	1/2000	BSA -T	100 μ L	1h a 37°C
Lavado		4 veces con Buffer de Lavado		
Sustrato	$20 \frac{mg}{mL}$	Buffer citrato	100 μ L	45 min

Figura 10

Esquema de la metodología del ELISAI



Interpretación de resultados. Para calcular el punto de corte se determinó la media de la OD de las muestras negativas y la desviación estándar. Con los datos obtenidos, a la media se le sumó 2 veces la desviación estándar para así obtener el punto de corte. El valor obtenido se utilizó como umbral de detección.

Los datos se representaron en base al porcentaje relativo de positividad (RPP) mediante la fórmula:

$$RPP = \frac{OD_{muestra} - OD_{controlnegativo}}{OD_{controlpositivo} - OD_{controlnegativo}}$$

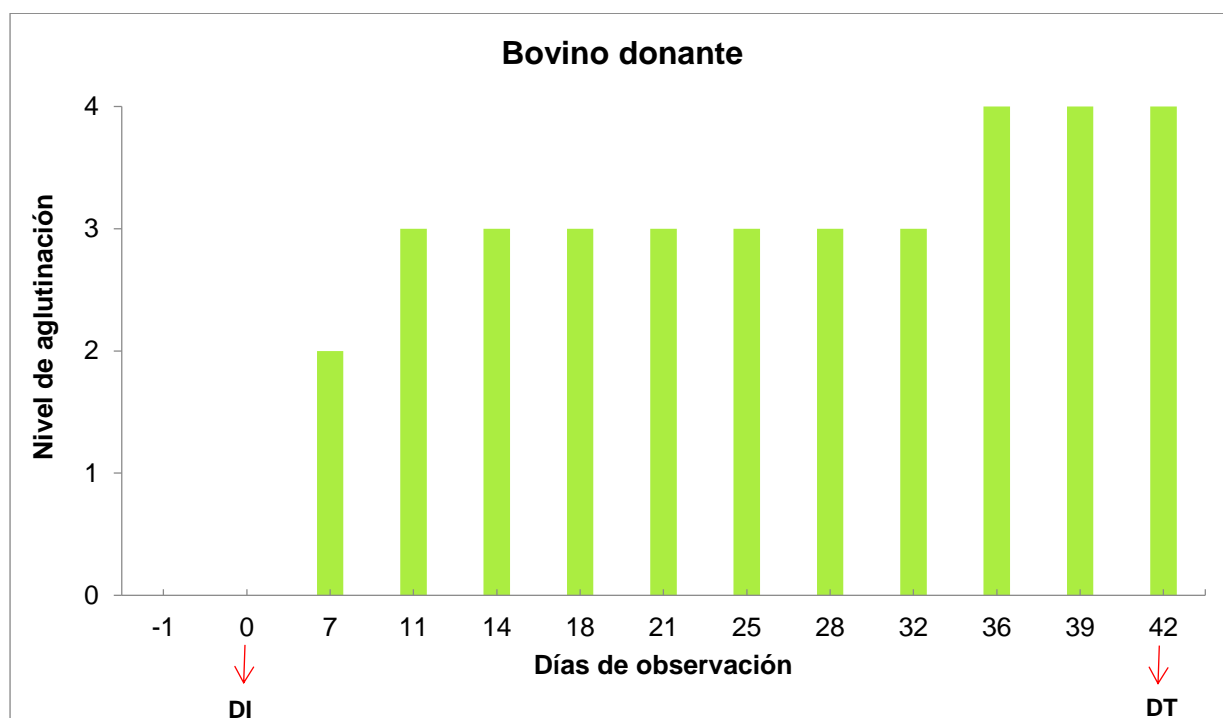
Capítulo IV: Resultados

Detección de anticuerpos IgM mediante el kit comercial CATT/T. evansi

El kit comercial CATT/T. *evansi* en el bovino donante permitió determinar una aglutinación moderada (nivel 2) en el día 7 post infección, del día 11 al 32 presentó una aglutinación fuerte (nivel 3) y, a partir del día 36 continuo siendo positivo con una aglutinación muy fuerte (nivel 4) hasta el día 42 que recibió un tratamiento con cloruro de isometamidium

Figura 11

Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/T. evansi en el bovino donante



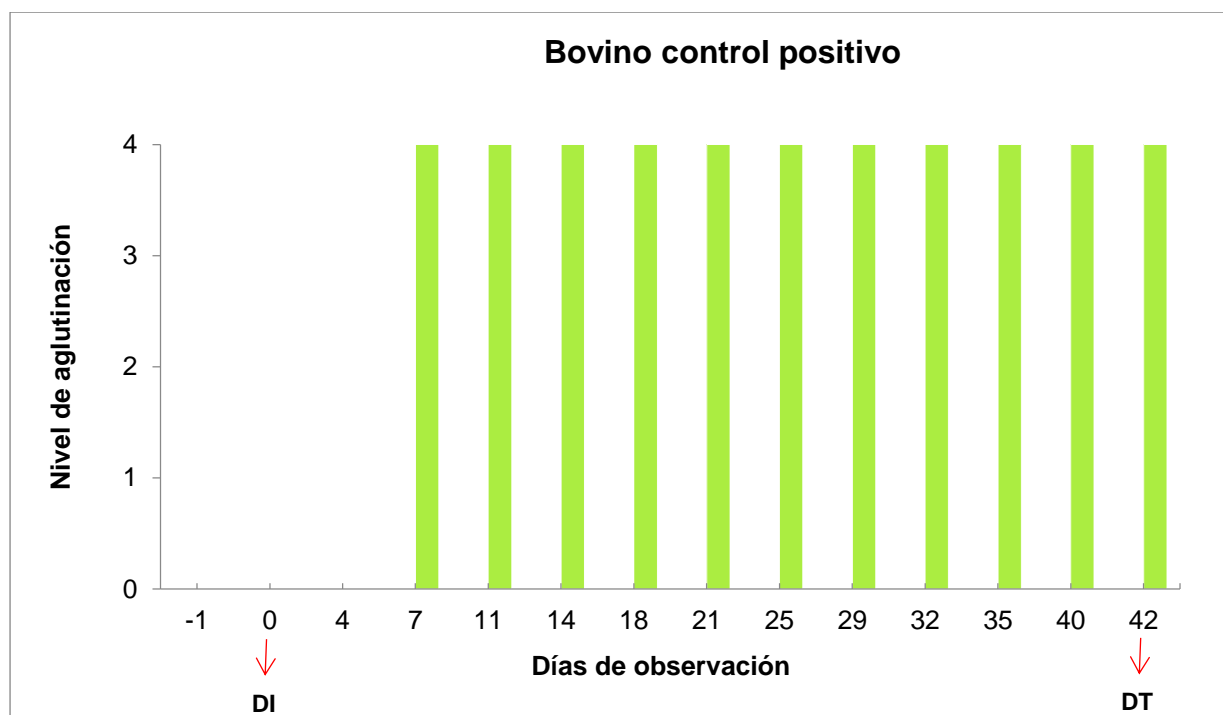
Nota. Niveles de aglutinación: 0=ausencia de aglutinación, 1= aglutinación débil, 2= aglutinación moderada, 3=aglutinación fuerte, y 4=aglutinación muy fuerte. Los días representativos durante el estudio experimental se denominan con las siglas DI= día de infección, y DT= día de tratamiento.

La aplicación del kit comercial CATT/T. *evansi* en el bovino control positivo permitió determinar una aglutinación muy fuerte (nivel 4) desde el día 7 hasta el día 42 que recibió

un tratamiento con cloruro de isometamidium. El bovino control negativo no presentó ningún nivel de aglutinación durante los 42 días que duro el estudio experimental.

Figura 12

Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/T. evansi en el bovino control positivo

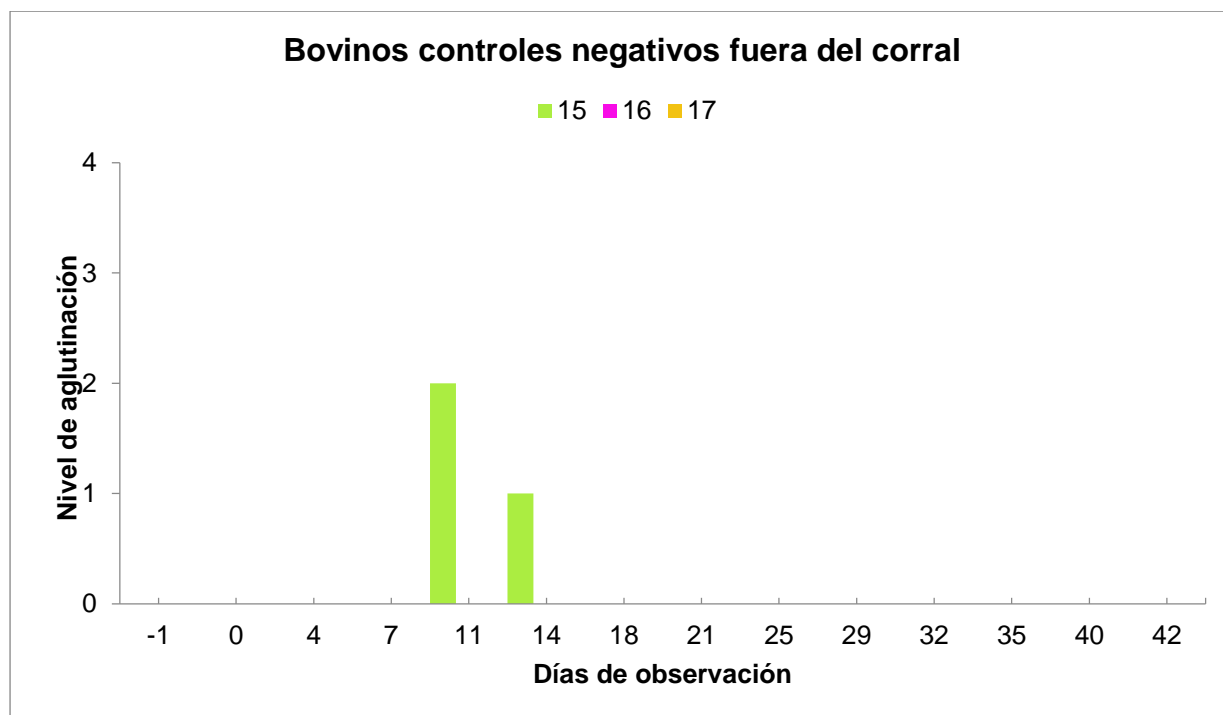


Nota. Niveles de aglutinación: 0=ausencia de aglutinación, 1= aglutinación débil, 2= aglutinación moderada, 3=aglutinación fuerte, y 4=aglutinación muy fuerte. Los días representativos durante el estudio experimental se denominan con las siglas DI= día de infección, y DT= día de tratamiento.

La figura 13 muestra la variación de los niveles de aglutinación durante el tiempo de observación de los bovinos controles negativos fuera del corral, el bovino 15 presentó una aglutinación moderada en el día 11 y una aglutinación débil en el día 14, los bovinos 16 y 17 no presentaron ninguna aglutinación durante los 42 días de observación.

Figura 13

Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/T. evansi en los bovinos controles negativos fuera del corral

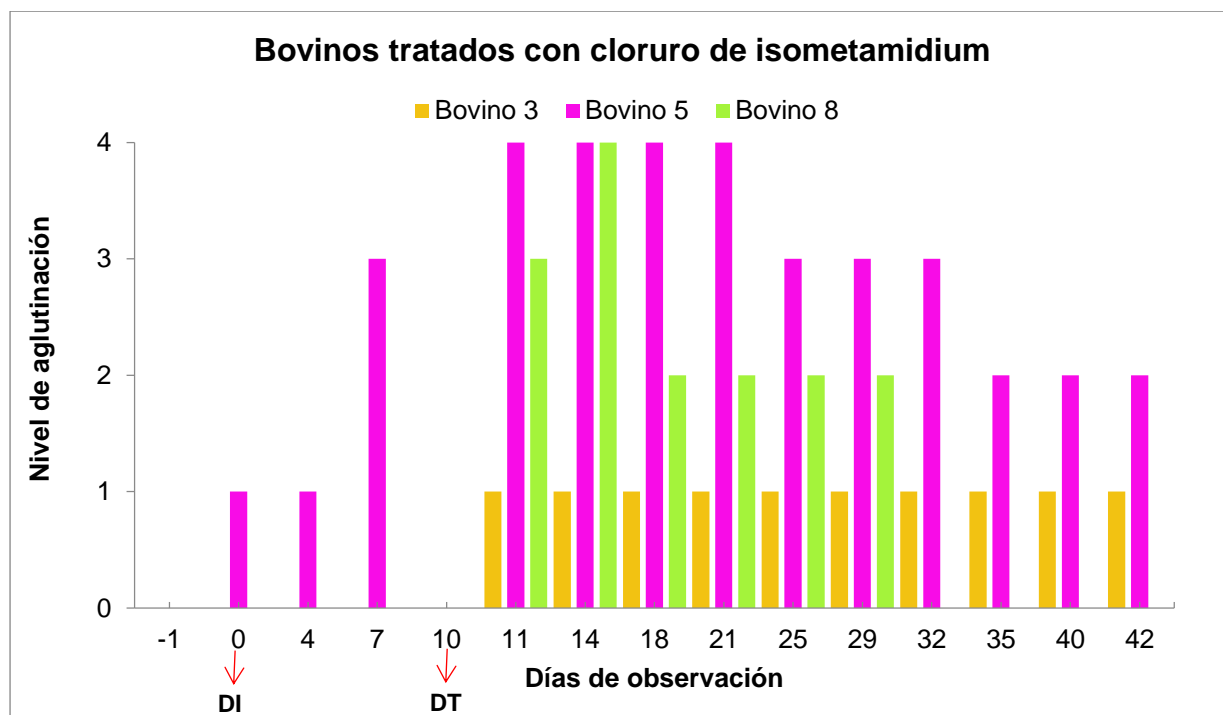


Nota. Niveles de aglutinación: 0=ausencia de aglutinación, 1= aglutinación débil, 2= aglutinación moderada, 3=aglutinación fuerte, y 4=aglutinación muy fuerte. Los días representativos durante el estudio experimental se denominan con las siglas DI= día de infección, y DT= día de tratamiento.

La figura 14 muestra la variación de los niveles de aglutinación durante el tiempo de observación de los bovinos tratados con cloruro de isometamidium, el bovino 3 presentó una aglutinación muy débil desde el día 11 al 42, el bovino 5 presentó aglutinación desde el día 0 hasta el día 42 con niveles de aglutinación desde 1 a 4, finalmente el bovino 8 presentó aglutinación desde el día 11 (nivel 3) hasta el día 29 (nivel 2) que falleció.

Figura 14

Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/T. evansi en los 3 bovinos tratados con cloruro de isometamidium (Hemoveex®) con 1 dosis de 1mL/50 Kg

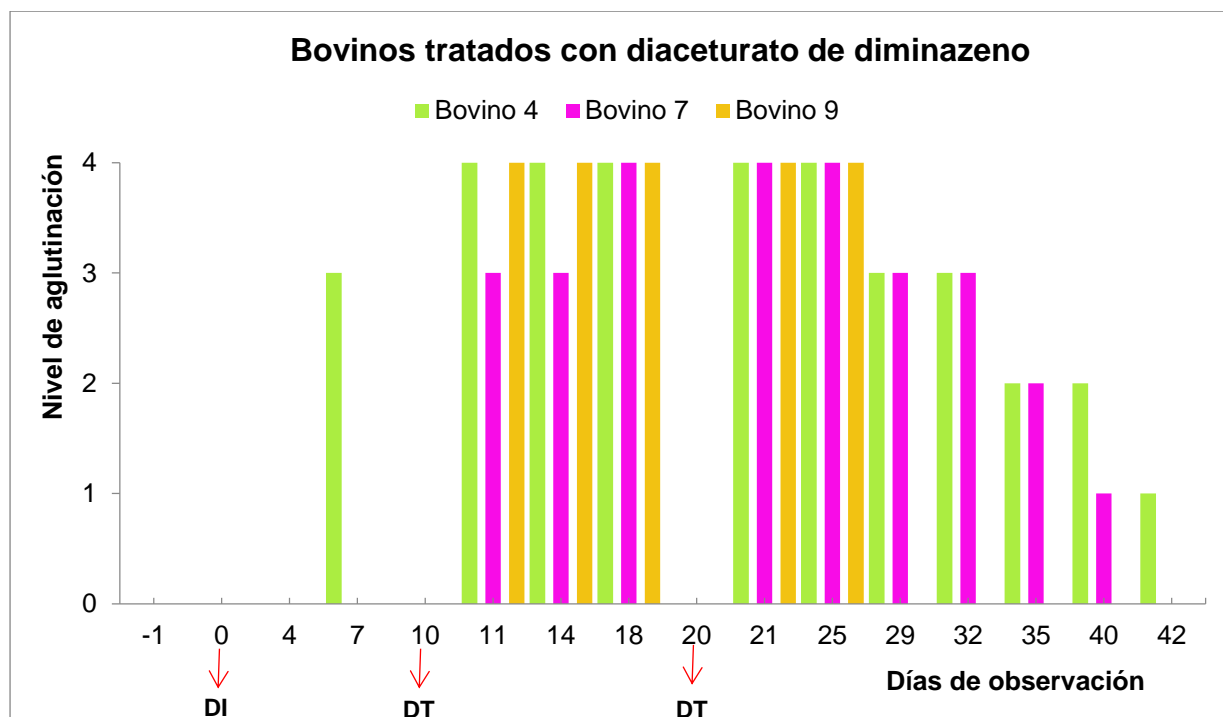


Nota. Niveles de aglutinación: 0=ausencia de aglutinación, 1= aglutinación débil, 2= aglutinación moderada, 3=aglutinación fuerte, y 4=aglutinación muy fuerte. Los días representativos durante el estudio experimental se denominan con las siglas DI= día de infección, y DT= día de tratamiento.

La figura 15 muestra la variación de los niveles de aglutinación durante el tiempo de observación de los bovinos tratados con diaceturato de diminazeno, el bovino 4 presentó aglutinación a partir del día 7 hasta el día 42 con niveles de 1 a 4, el bovino 7 presentó aglutinación desde el día 11 al 40 y el día 42 no presentó aglutinación, el bovino 9 presentó una aglutinación muy fuerte a partir del día 11 hasta el día 25, y falleció poco tiempo después por lo que no presenta más observaciones.

Figura 15

Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/T. evansi en los 3 bovinos tratados diaceturato de diminazeno (Berenil®) con 2 dosis de 1mL/20Kg

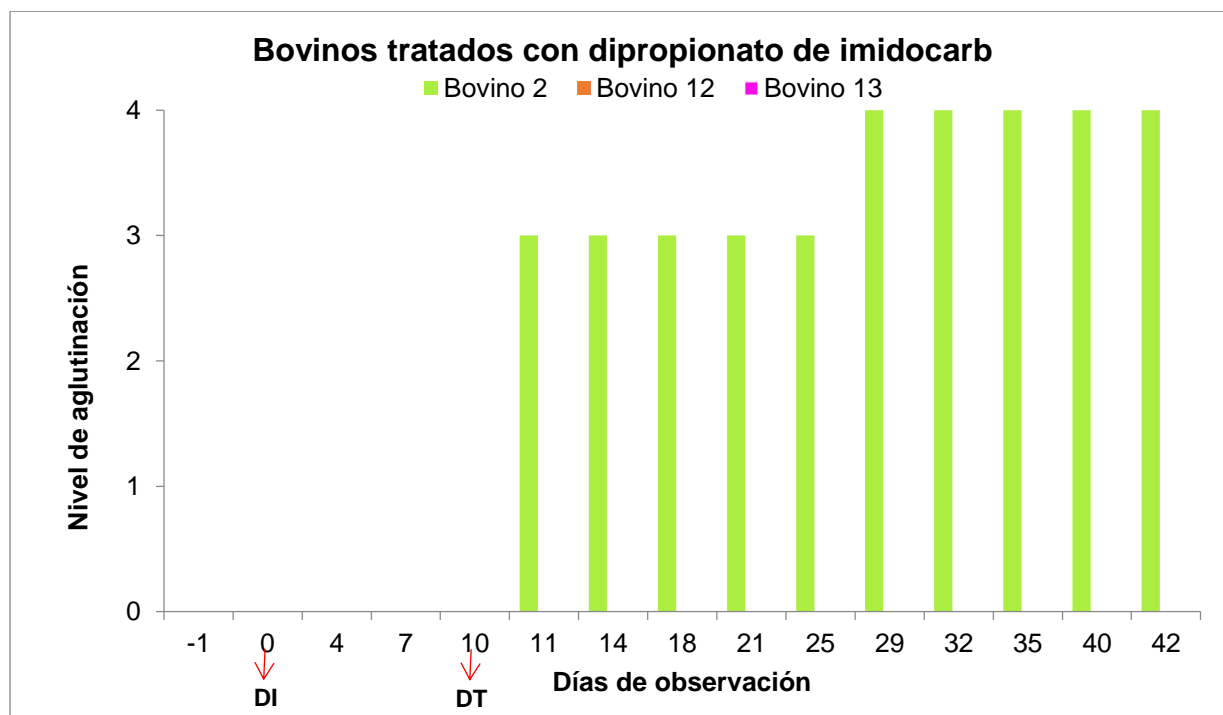


Nota. Niveles de aglutinación: 0=ausencia de aglutinación, 1= aglutinación débil, 2= aglutinación moderada, 3=aglutinación fuerte, y 4=aglutinación muy fuerte. Los días representativos durante el estudio experimental se denominan con las siglas DI= día de infección, y DT= día de tratamiento.

La figura 16 muestra la variación de los niveles de aglutinación durante el tiempo de observación de los bovinos tratados con dipropionato de imidocarb, el bovino 2 presentó aglutinación fuerte a partir del día 11 al día 25 y una aglutinación muy fuerte a partir del día 19 al 42, los bovinos 12 y 13 fallecieron antes de D11 por lo que no presentan observaciones, ya que hasta el día 7 no presentaron aglutinación.

Figura 16

Niveles de aglutinación detectados con el kit comercial CATT/T. evansi en los 3 bovinos tratados dipropionato de imidocarb (Imidocarb®) con 1 dosis de 2.5 mL/100Kg



Nota. Niveles de aglutinación: 0=ausencia de aglutinación, 1= aglutinación débil, 2= aglutinación moderada, 3=aglutinación fuerte, y 4=aglutinación muy fuerte. Los días representativos durante el estudio experimental se denominan con las siglas DI= día de infección, y DT= día de tratamiento.

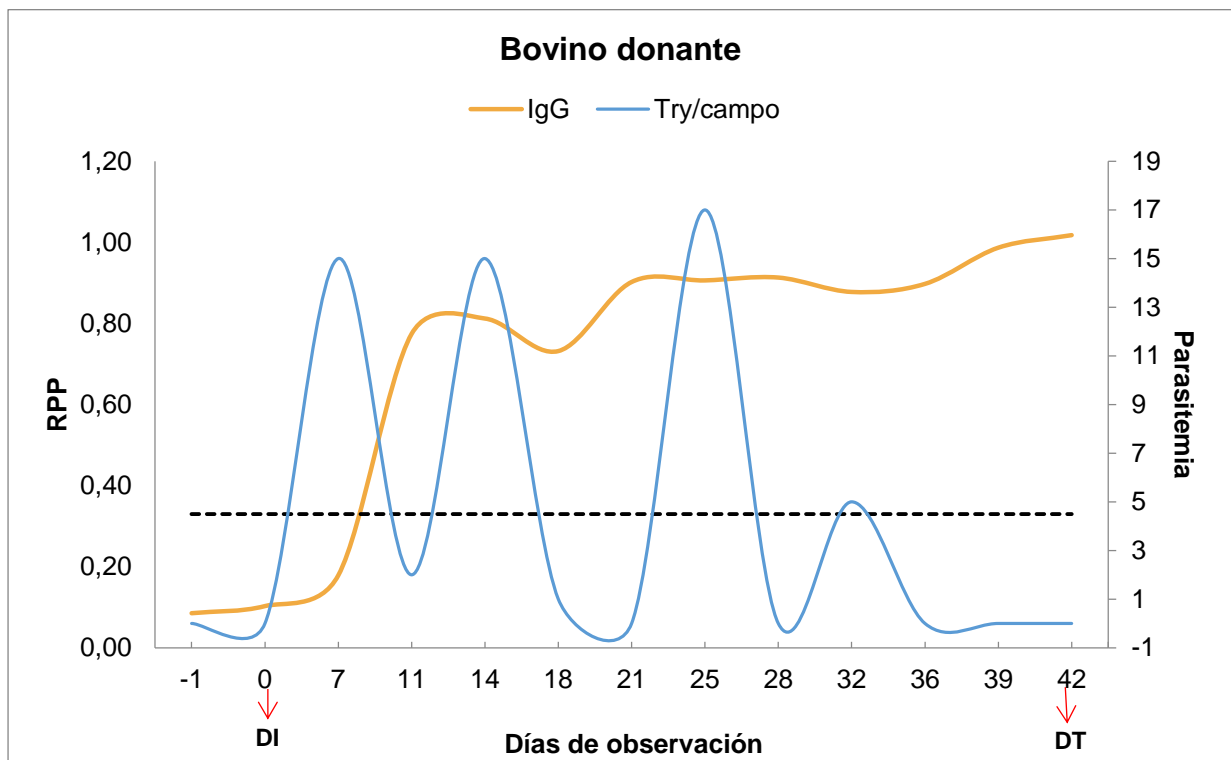
Detección de anticuerpos IgG mediante la prueba ELISAI

Los resultados de la prueba ELISAI del bovino donante se presentan en la figura 17, se puede evidenciar que el bovino donante fue positivo a partir del día 11 post infección, la curva se mantiene oscilante de forma ascendente hasta el día 42. También se observa la curva de parasitemia, evaluada mediante gota gruesa, el día 25 post infección se observó el

pico con un conteo de 25 trypanosomas / campo. El donante recibió el tratamiento con cloruro de isometamidium el día 42

Figura 17

Variación de IgG mediante ELISAI en el bovino donante



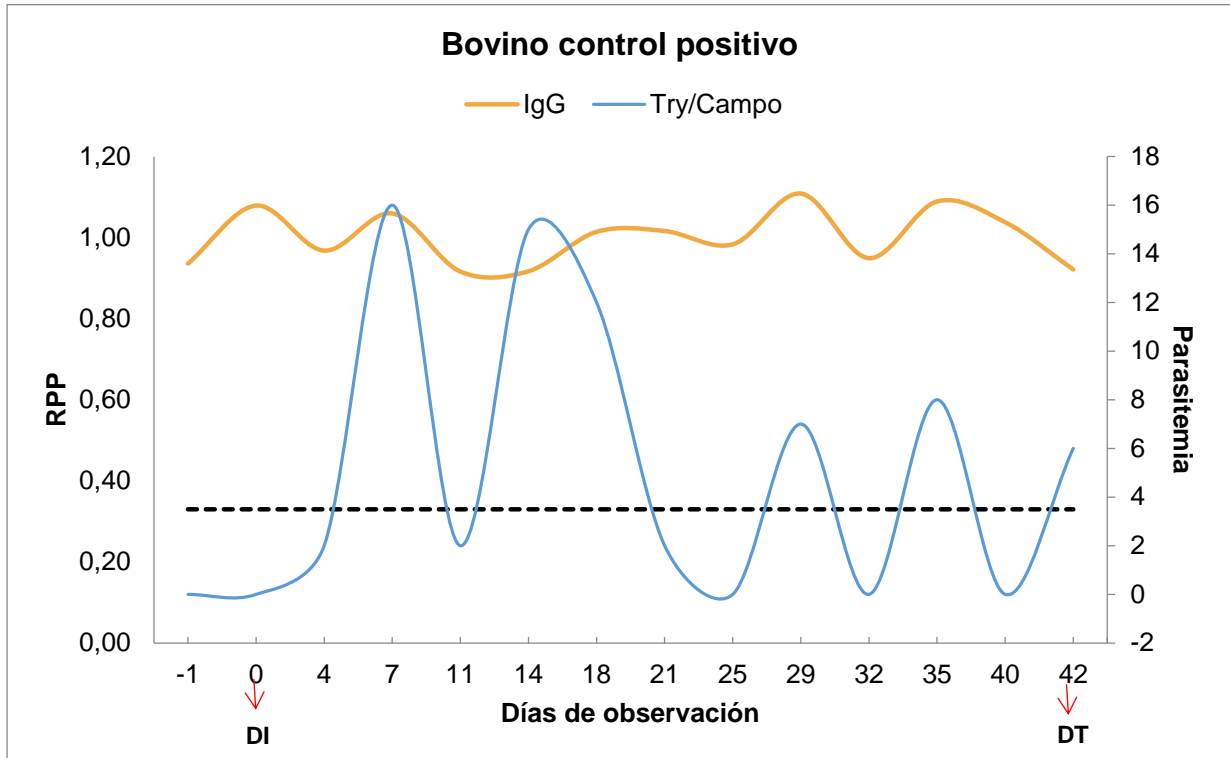
Nota. RPP: porcentaje relativo de positividad, DI: día de infección, DT: día de tratamiento.

La línea horizontal en 0,33 representa el cut-off representativo

Los resultados de la prueba ELISAI del bovino control positivo se presentan en la figura 18, se puede evidenciar que el bovino control positivo dentro del corral fue positivo incluso antes del día de la infección (día 0), la curva se mantuvo ascendente hasta el día 42. También se observa la curva de parasitemia, evaluada mediante gota gruesa, el día 7 post infección se observó el pico con un conteo de 16 trypanosomas / campo. El bovino control positivo recibió el tratamiento con cloruro de isometamidium el día 42

Figura 18

Variación de IgG mediante ELISAi en el bovino control positivo



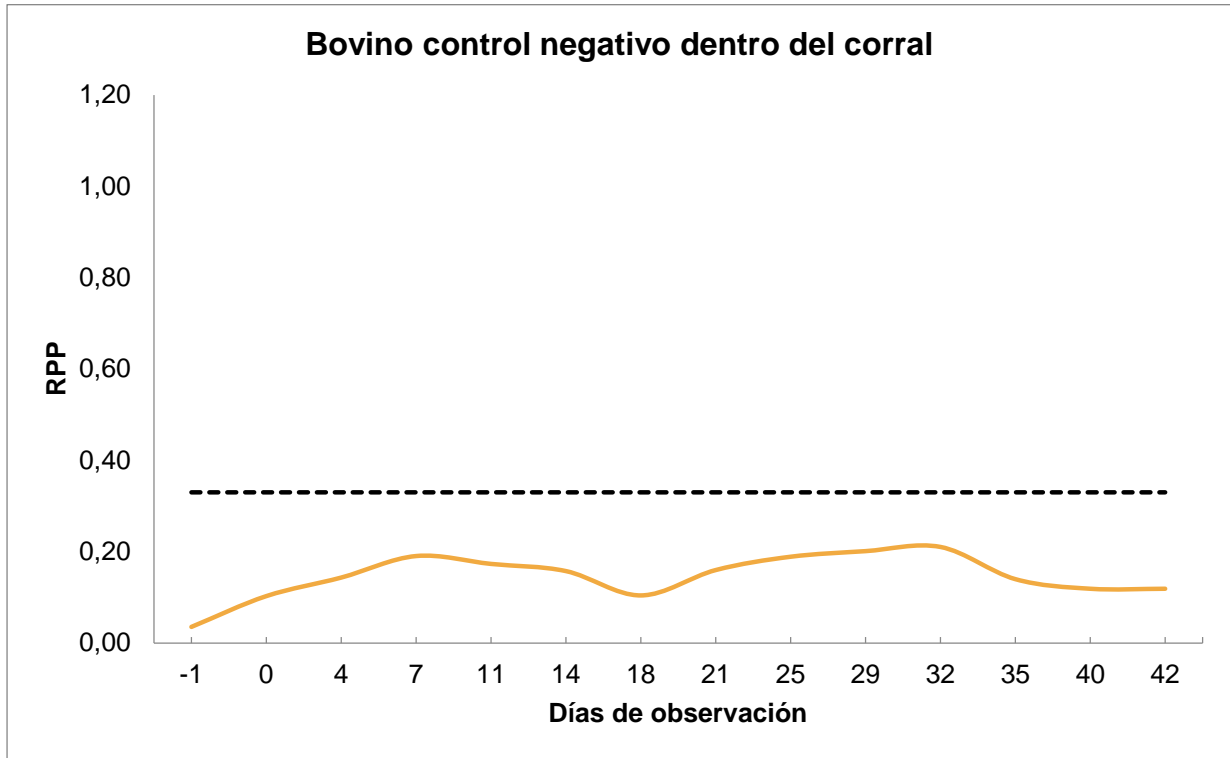
Nota. RPP: porcentaje relativo de positividad, DI: día de infección, DT: día de tratamiento.

La línea horizontal en 0,33 representa el cut-off representativo

Los resultados de la prueba ELISAi del bovino control negativo se presentan en la figura 19, se puede evidenciar que el bovino control negativo dentro del corral se mantuvo negativo desde el inicio de la observación (día -1) hasta el final (día 42)

Figura 19

Variación de IgG mediante ELISAI en el bovino control negativo dentro del corral

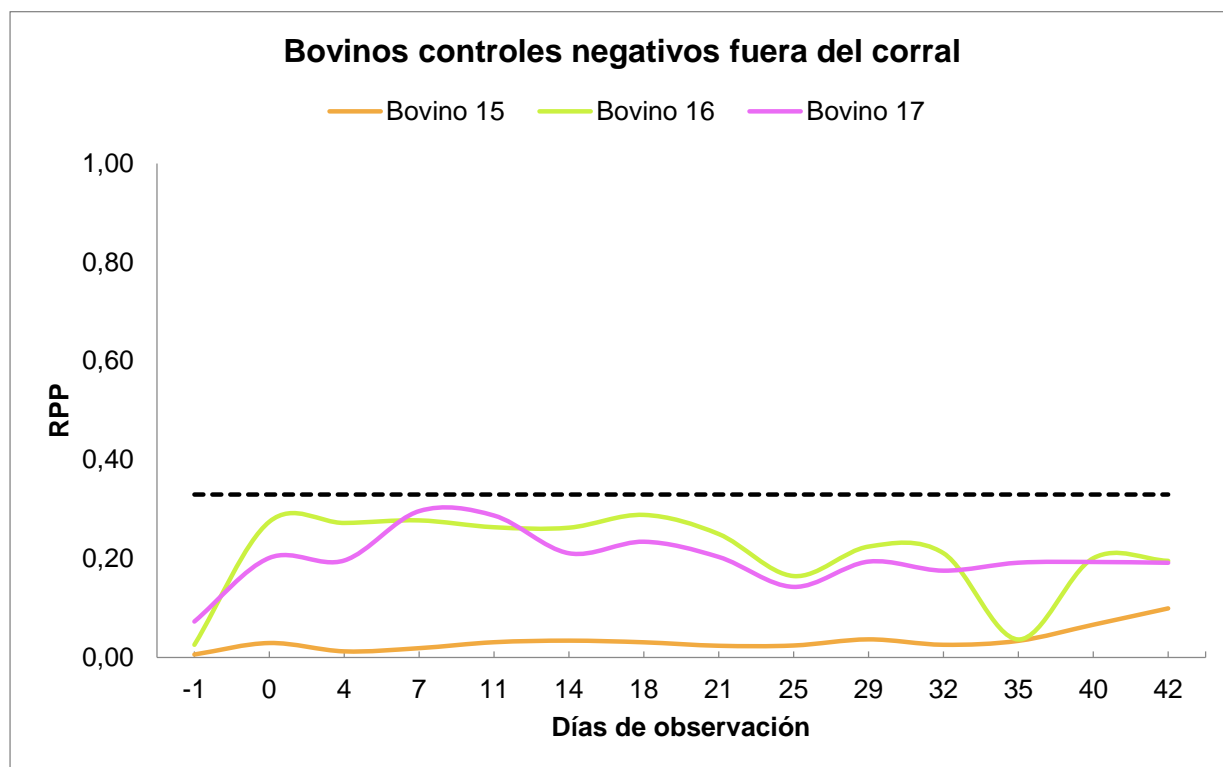


Nota. RPP: porcentaje relativo de positividad, DI: día de infección, DT: día de tratamiento, Try: Trypanosomas. La línea horizontal en 0,33 representa el cut-off representativo

Los resultados de la prueba ELISAI de los bovinos controles negativos fuera del corral se presentan en la figura 20, los bovinos 15, 16 y 17 se mantuvieron negativos desde el inicio de la observación (día -1) hasta el final (día 42)

Figura 20

Variación de IgG mediante ELISAI en los bovinos controles negativos fuera del corral



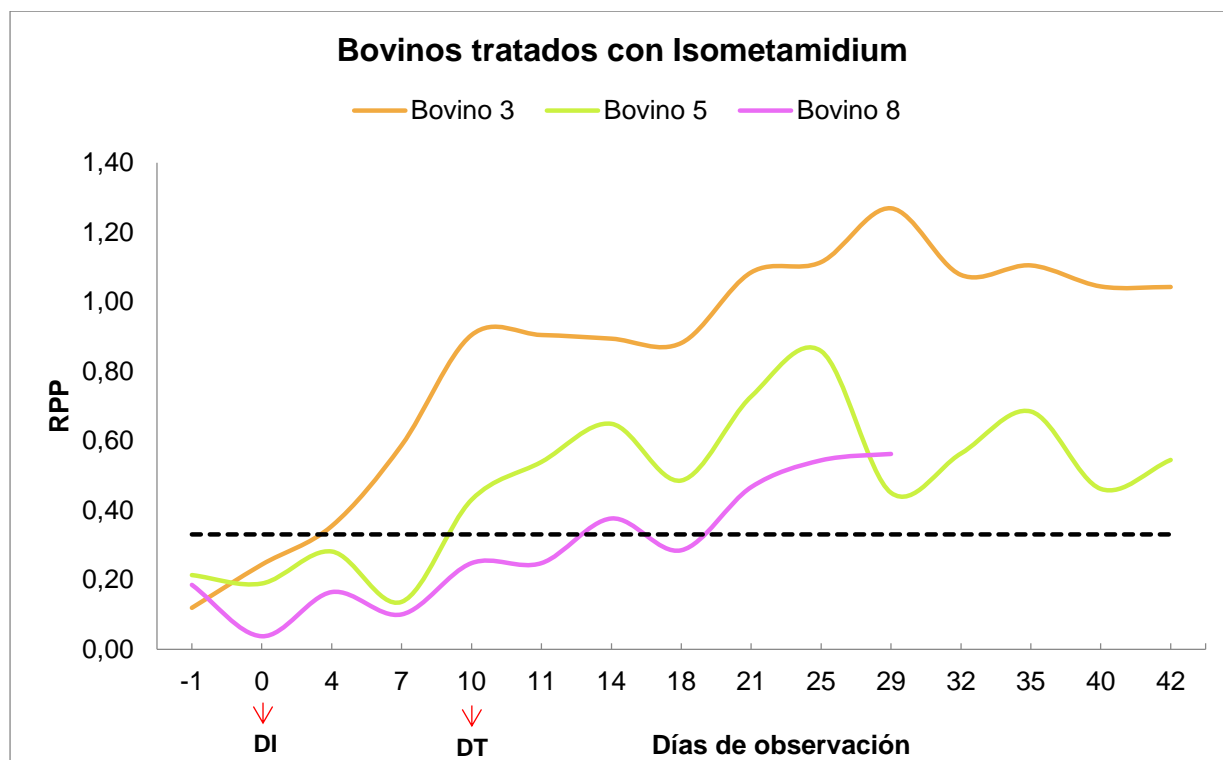
Nota. RPP: porcentaje relativo de positividad. La línea horizontal en 0,33 representa el cut-off representativo

Los resultados de la prueba ELISAI de los bovinos tratados con cloruro de isometamidium se presentan en la figura 21, los bovinos 3 y 5 fueron positivos a partir del día 10, el bovino 8 fue positivo a partir del día 21 y su última observación fue el día 29 ya que falleció. Las 3 curvas se mantienen oscilantes durante los 42 días de observación post infección

Los valores de IgG de los bovinos 8 y 5 son más bajos que el bovino 3, esto concuerda con sus niveles de parasitemia ya que, el bovino 8 presentó un pico de 8 trypanosomas/campo el día 7, el bovino 5 presentó un pico de 12 trypanosomas/campo el día 7 y el bovino 3 presentó un pico de 15 trypanosomas/campo el día 7, mediante el análisis por gota gruesa. Las curvas se pueden observar a partir del Apéndice A al C.

Figura 21

Variación de IgG mediante ELISAI en los 3 bovinos tratados con cloruro de isometamidium (Hemoveex®) con 1 dosis de 1mL/50 Kg



Nota. RPP: porcentaje relativo de positividad, DI: día de infección, DT: día de tratamiento.

La línea horizontal en 0,33 representa el cut-off representativo

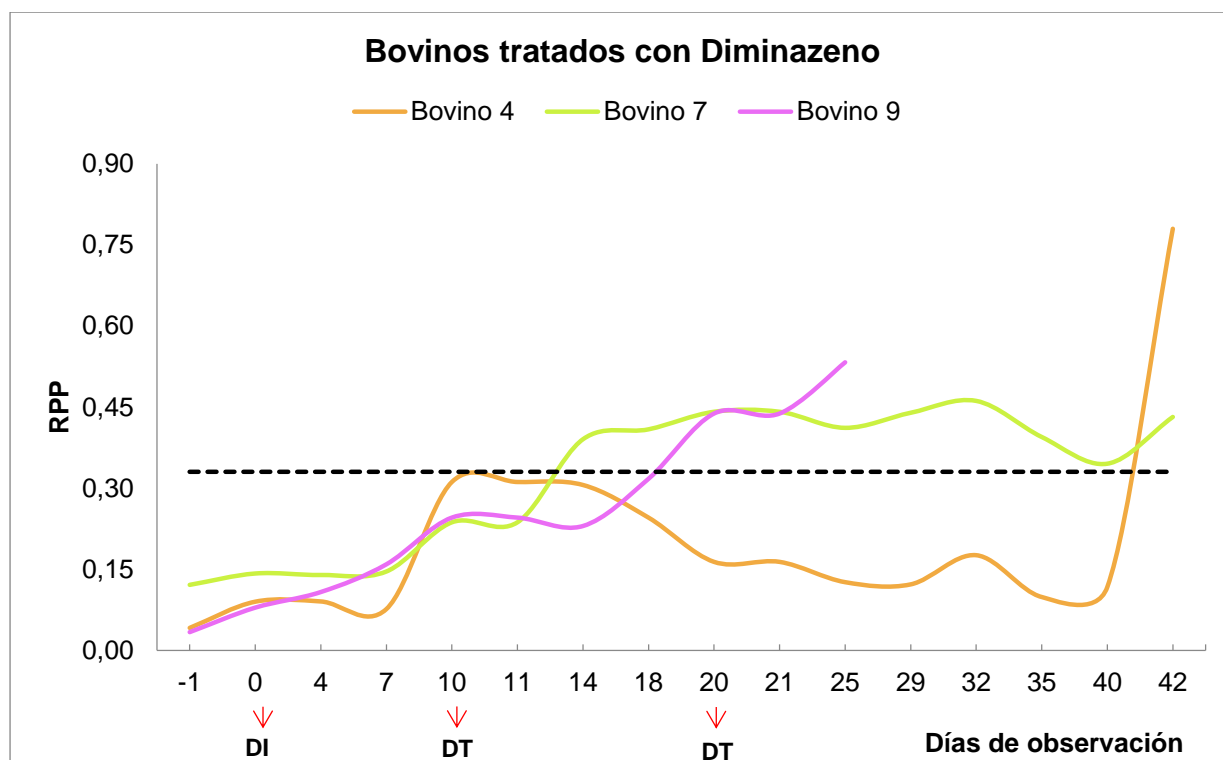
Los resultados de la prueba ELISAI de los bovinos tratados con diaceturato de diminazeno se presentan en la figura 22, el bovino 4 presentó un único valor positivo en el día 42, el bovino 7 presentó valores positivos desde el día 14 y el bovino 9 presentó valores positivos a partir del día 20, hasta el día 25 que fue su última observación ya que falleció poco tiempo después. Las 3 curvas se mantienen oscilantes durante los 42 días de observación post infección

El único valor positivo para IgG del bovino 4 se observó en el día 42, este bovino presentó el pico de parasitemia más bajo de su grupo, con un valor máximo de 6 trypanosomas/campo, mientras que los bovinos 7 y 9 presentaron un pico 10 y 12 trypanoso-

mas/campo, respectivamente, mediante el análisis por gota gruesa. Las curvas se pueden observar a partir del Apéndice D al F.

Figura 22

Variación de IgG mediante ELISAI en los 3 bovinos tratados con diaceturato de diminazeno (Berenil®) con 2 dosis de 1mL/20Kg



Nota. RPP: porcentaje relativo de positividad, DI: día de infección, DT: día de tratamiento.

La línea horizontal en 0,33 representa el cut-off representativo

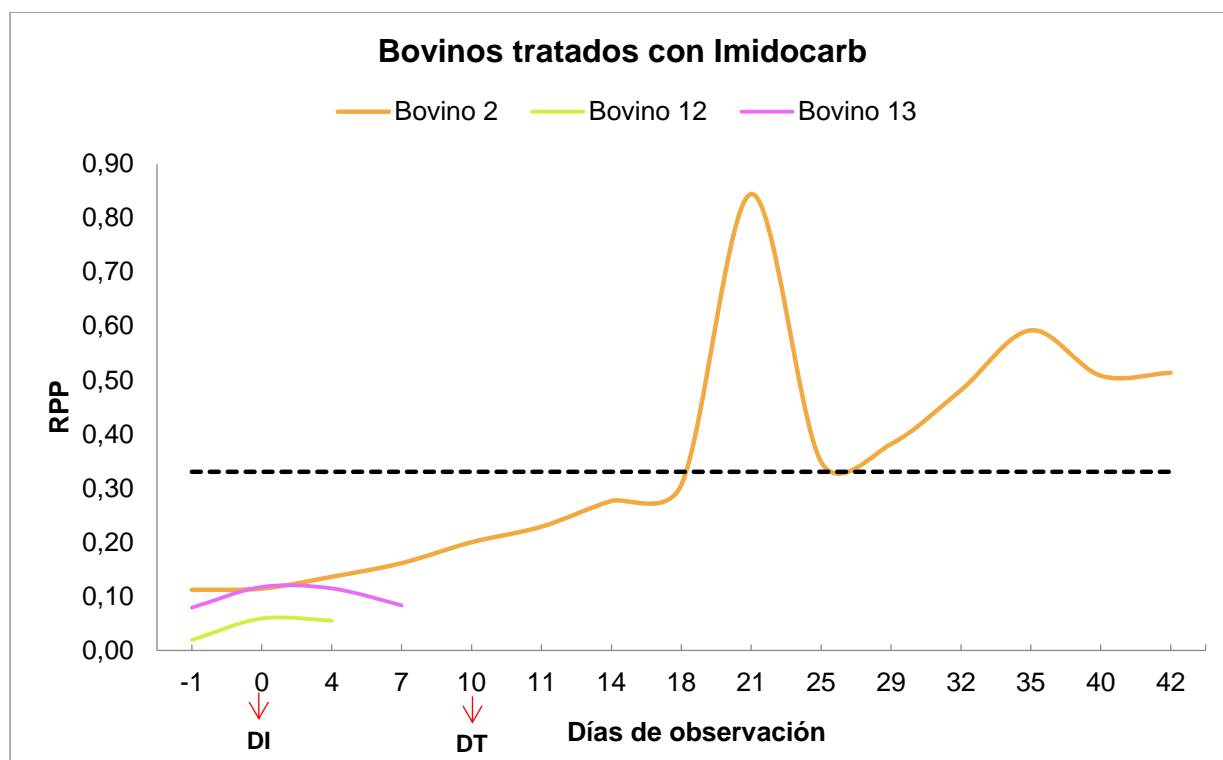
Los resultados de la prueba ELISAI de los bovinos tratados con dipropionato de imidocarb se presentan en la figura 23, el bovino 2 presentó valores positivos a partir del día 21 y hasta el día 42, los animales 12 y 13 fallecieron antes del día 11 por lo que no presentaron ningún valor positivo. La curva del animal 2 se mantuvo oscilante con tendencia descendente hasta el día 42 de observación post infección

El valor mínimo de IgG se presentó el día 25 post infección, este día concuerda con los análisis de parasitemia donde el día 25 se volvió a observar trypanosomas en el análisis

por gota gruesa. La comparación de anticuerpos y parasitemia se puede observar en el Apéndice H.

Figura 23

Variación de IgG mediante ELISAI en los 3 bovinos tratados con dipropionato de imidocarb (Imidocarb®) con 1 dosis de 2.5 mL/100Kg



Nota. RPP: porcentaje relativo de positividad, DI: día de infección, DT: día de tratamiento.

La línea horizontal en 0,33 representa el cut-off representativo

Capítulo V: Discusión

CAAT/ *T. evansi* es una prueba de aglutinación en carta vendido comercialmente, que utiliza el suero sanguíneo para la detección de anticuerpos y está recomendado por la OMSA, se utiliza principalmente para detectar IgM (Reck, Menin, Batista, Oliveira, & Miletti, 2021; Desquesnes, et al., 2022). El kit comercial CAAT/ *T. evansi* utiliza como antígeno a la glicoproteína de superficie variante de *T. evansi* llamada RoTat 1.2 y al ser una prueba de

aglutinación directa se puede aplicar en cualquier tipo de huésped por lo que también se utiliza en humanos (Birhanu, et al., 2015).

Se aplicó el kit comercial CAAT/ *T. evansi* debido a la reactividad cruzada que presenta *T. evansi* con *T. vivax* y debido a que la producción en el laboratorio del antígeno de *T. vivax* ha sido muy complicada, una de sus limitantes es el hospedador, ya que no crece fácilmente en roedores a diferencia de *T. evansi* del cual se pueden obtener cantidades suficientes para la preparación de antígenos que se utilizan en pruebas serológicas (Uzcanga, et al., 2004). Estudios realizados de infecciones con otros trypanosomas como *T. vivax* han dado resultados positivos en CAAT/ *T. evansi* como sugirió un estudio realizado en Surinam (Birhanu, et al., 2015).

Se han realizado pruebas como ELISA, Western blot y microscopía de inmunofluorescencia que han demostrado la alta reactividad cruzada inmunológica entre *T. vivax* y *T. evansi* ya que a pesar de la cantidad de genes VSG existentes en ambos trypanosomas, los anticuerpos anti-*T. evansi* y anti-*T. vivax* reconocen la forma soluble de la VSG purificada de un aislado de *T. evansi*, conocido como TEVA1, la inmunotransferencia demostró que hay una serie de polipéptidos presentes en la fracción antigénica de *T. evansi* que trabaja como antígeno común para anticuerpos anti- *T. evansi* y anti- *T. vivax*, estos polipéptidos oscilan desde los 14 a 109 kDa (Reyna, García, Rivera, Sánso, & Aso, 1998; Uzcanga, Mendoza, Aso, & Bubis, 2002; Uzcanga, et al., 2004).

Para el presente estudio se infectaron 11 bovinos y su seroconversión positiva para el kit comercial CAAT/ *T. evansi* se observó de la siguiente manera: 3 de los 11 bovinos (el control positivo, el donante, bovino número 4) mostraron seroconversión positiva en el día 7, 5 de los 11 bovinos (los bovinos número 2, 3, 7, 8 y 9) mostraron seroconversión positiva en el día 11 y el bovino número 5 mostro aglutinación débil a partir del día 0. Los resultados obtenidos concuerdan con otro estudio de una infección experimental con la cepa Egypt CD1 de *T. evansi* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en los cuales la seroconversión fue

detectada a los días 8 y 12 utilizando el mismo kit comercial CAAT/ *T. evansi* y bajo las mismas condiciones (Hilali, Abdel, Nassar, Magnus, & Büscher, 2004).

Las IgM son el primer anticuerpo que se secreta durante la respuesta inmune por lo cual son la primera línea de defensa y al ser inmunoglobulinas pentavalentes con afinidad muy alta hacia el antígeno pueden formar redes con el antígeno formando aglutinaciones por lo cual se la conoce como aglutinina (Schroeder & Cavacini, 2010; Blandino & Baumgarth, 2019).

Para el seguimiento de los niveles de aglutinación quedaron 9 bovinos infectados, los niveles de aglutinación de los bovinos tratados con cloruro de isometamidium (bovinos número 3, 5 y 8) empezaron a descender a partir del día 18 post infección, en los bovinos tratados con diaceturato de diminazeno (bovinos número 4, 7 y 9) los niveles de aglutinación empezaron a descender a partir del día 29 post infección, mientras que los bovinos tratados con dipropionato de imidocarb (bovinos número 2, 12 y 13) mantuvieron un nivel de aglutinación muy fuerte hasta el final. Los bovinos que presentaron novedades fueron: el bovino número 7 que presentó un nivel de aglutinación 0 en el día 42 y el bovino número 3 que presentó una aglutinación débil desde el día 11 al 42. IgM tiene una vida media que va de 1 a 3 meses aproximadamente y puede persistir 2.3 a 22.6 meses después del tratamiento tripanocida por lo cual en los 3 grupos de fármacos los niveles de IgM se mantienen hasta la última observación en los bovinos infectados experimentalmente a excepción de los bovinos 7 y 3 (Birhanu, et al., 2015)

La membrana del trypanosoma está cubierta por VSG y cuando el sistema inmune del huésped reconoce un tipo de antígeno variable (VAT), el sistema inmune elimina y fagocita los parásitos que presenten el mismo VAT. Los trypanosomas que presentan otro VAT diferente al VAT reconocido anteriormente por el sistema inmune, se multiplican y generan un nuevo pico de parasitemia generando así nuevas IgM, y así sucesivamente por lo que las IgM se mantienen constantes (Tehseen, et al., 2015). Una de las desventajas de la IgM

es que es capturada como inmunocomplejos por células fagocíticas pudiendo dar de esta manera falsos negativos en CAAT/ *T. evansi* (Desquesnes, et al., 2022).

Los controles negativos se mantuvieron con ausencia de aglutinación durante los 42 días post infección; sin embargo, el bovino 15, uno de los controles negativos fuera del corral, mostró niveles de aglutinación moderada en día 11 y una aglutinación débil en el día 14 esto se puede dar debido a que CAAT/ *T. evansi* no es 100% específico por lo que se pueden producir falsos positivos debido a los epítomos de reacción cruzada del antígeno RoTat 1.2 (Birhanu, et al., 2015; Tehseen, et al., 2015).

Para el análisis de IgG se utilizó la prueba ELISAI, la seroconversión positiva para IgG de los 11 bovinos infectados se presentó de la siguiente manera: el bovino número 3 presentó la seroconversión en el día 7, el bovino donante y el bovino número 5 en el día 11, los bovinos número 7 y 8 en el día 14, los bovinos número 2 y 9 en el día 21, el bovino número 4 presentó seroconversión en el día 40, mientras que, el control positivo presentó un nivel alto de IgG incluso antes de la infección (día -1) y finalmente los 2 bovinos faltantes fallecieron antes del día 11 por lo que tampoco se observó su seroconversión positiva para IgG. La IgG contra los trypanosomas puede ser detectada en el suero a partir de la semana 2 a 3 después de la infección, esto se da especialmente cuando se utiliza el antígeno lisado de células enteras (Desquesnes, et al., 2022).

En el caso del control positivo que presentó valores altos de IgG desde el inicio del estudio, es decir desde el día -1, se conoce que la prueba ELISA presenta alta sensibilidad y especificidad a nivel del género, pero la especificidad de especie es generalmente baja debido a las reacciones cruzadas por los antígenos comunes compartidos entre los trypanosomas del grupo salivar, o incluso entre especies taxonómicamente distantes por lo que la seropositividad es cuestionable (Eisler, Lessard, Masake, Mooloo, & Peregrine, 1998; Desquesnes, et al., 2022). Se ha observado que las infecciones por trypanosomas pueden aumentar en animales coinfectados con nematodos, como en el caso de la raza de ganado

N'dama que es más susceptible a la infección por *T. congolense* o *T. vivax* cuando está infectado por nematodos tricostígilos (Cox, 2001).

Ensayos utilizando la prueba ELISA para el diagnóstico de *Leishmania infantum*, ha demostrado la reactividad cruzada con otros parásitos como: *Trypanosoma cruzi*, *Neospora caninum*, *Babesia canis* y *Toxoplasma gondii*, lo que significa un factor limitante por parte de las pruebas serológicas para la detección de parásitos debido a la reactividad cruzada entre especies taxonómicamente diferentes (Zanette, et al., 2013). Estas limitaciones también se han presentado al obtener falsos positivos debido a altas reactividades cruzadas inmunológicas entre helmintos, como se ha reportado con *Trichinella spiralis*, *Ascaris suum*, y *Toxocara canis* (Aronstein, Lewis, Norden, Dalton, & Strand, 1986). Es posible que se presenten falsos positivos debido a las glucoproteínas presentes en el antígeno de *T. vivax*, como se ha evidenciado en ELISA para la detección de *T. evansi*, debido al reconocimiento inespecífico por parte de los anticuerpos en los sueros negativos hacia los epítomos glucosídicos (Reyna, Eleizalde, & Silva, 2007).

En el caso del bovino que presentó la seroconversión positiva en el día 40 se ha visto que la aparición tardía se da cuando no hay suficiente cantidad de IgG para controlar los niveles de parasitemia y el incremento tardío de los niveles de IgG reflejarían un cambio de isotipo inducido por la muerte del parásito después del tratamiento y una gran proporción de los antígenos, son procesados y presentados de manera más efectiva y se refleja en los niveles de IgG (Boeira, et al., 2018).

De los 15 bovinos pertenecientes al estudio 4 fallecieron antes de los 42 días post infección, en la trypanosomosis bovina la inmunosupresión es una característica conocida por lo cual en infecciones con *T. vivax* se han visto infecciones bacterianas secundarias, por lo cual se ha observado que los bovinos infectados han fallecido por infecciones oportunistas (Osório, et al., 2008). En infecciones por *T. vivax* las células CD5⁺B1 son la principal fuente de respuesta polirreactiva de IgM, la activación policlonal de las células B se considera parte de la inmunosupresión que reduce la posibilidad de que se desarrolle una respues-

ta inmunitaria eficaz contra antígenos cruciales (Magez, Pinto, Obishakin, & Radwanska, 2020).

En todos los bovinos infectados del presente estudio experimental se observó que después de la primera detección de IgG los niveles variaban con respecto al tiempo, lo que coincide con otros estudios ya que los niveles de parasitemia en bovinos infectados con *T. vivax* tienen una oscilación representativa que indica la eliminación inmunológica y la proliferación de poblaciones de trypanosomas diferentes antigénicamente (Uzcanga, et al., 2016). Cada periodo de alta parasitemia corresponde al crecimiento de una población de trypanosomas con un nuevo antígeno glucoproteico de superficie, esto se da como una técnica de evasión al sistema inmune del hospedador, la VSG es considerada el principal antígeno de los trypanosomas y va a cambiar conforme avanza la infección, de manera que la VSG inicial se libera cuando se produce un cambio genético y es sustituido por una VSG antigénicamente diferente, expresándose cada vez un gen de los mil genes de VSG (Tizard, 2009). La IgG es detectada durante todo el curso de la infección y en estudios se ha observado que presenta altos niveles después de los picos de la parasitemia, los altos niveles de anticuerpos han sido descritos como mecanismos de control de la parasitemia por lo que se sugiere que la reducción de la parasitemia y los signos clínicos están directamente asociados con el incremento de IgG (Boeira, et al., 2018)

En los 3 grupos de tratamientos se observó la presencia de IgG hasta el final del seguimiento experimental (42 días post infección), este comportamiento se ha observado en otros estudios ya que la prueba ELISA es una técnica muy utilizada en los ensayos seroepidemiológicos, detectando animales positivos después de un tratamiento curativo. Bovinos mestizos infectados con *T. vivax* demostraron que se puede observar animales seronegativos dentro de 3 a 4 meses en el caso de animales jóvenes y adultos, mientras que en los animales geriátricos se observa la seroconversión negativa hasta 6 meses después de tratarlos con aceturato de diminazeno en dosis de 7mg/kg completamente curativa (Desquesnes, Bengaly, & Dia, 2003). También hay que tener en cuenta que el ELISA detecta una

respuesta inmune para infecciones actuales y pasadas, es decir, que aunque la prueba indique la detección de anticuerpos contra el parásito no confirma una infección activa ya que las IgG se mantienen después del tratamiento, pero si la muestra ha sido tomada más de 6 meses después del tratamiento tripanocida, un resultado seropositivo sugiere una infección activa (Desquesnes M., 2017).

En el Ecuador no existe un tratamiento específico para *T. vivax*, sin embargo, en Brasil los 2 medicamentos autorizados por el ministerio de agricultura, ganadería y abastecimiento son: el aceturato de diminazeno y el cloruro de isometamidium (Garcia, et al., 2021). En un estudio realizado en bovinos infectados experimentalmente con *T. vivax* y tratados con diaceturato de diminazeno, dipropionato de imidocarb y cloruro de isometamidium en dosis de 7 mg/kg, 4,8 mg/kg y 0,5 - 1,0 mg/kg respectivamente, se observó que el ganado que recibió cloruro de isometamidium permaneció libre de parásitos, el ganado que recibió diaceturato de diminazeno se re infectó a los 50 días y el ganado que recibió dipropionato de imidocarb mostró nuevamente trypanosomas a los 10-14 días post tratamiento, concluyendo que el cloruro de isometamidium tiene una eficacia del 100% al igual que diaceturato de diminazeno y que la observación de parásitos puede deberse a la corta vida media del fármaco, mas no a la resistencia al fármaco (Azeredo, et al., 2020). Estudios anteriores han demostrado la resistencia de cepas de la Guayana Francesa al aceturato de diminazeno a las máximas dosis recomendadas (7mg/Kg) y actualmente en Brasil se reportó una posible resistencia al cloruro de isometamidium aplicado en dos dosis de 1,0 mg/Kg (Desquesnes, Rocque, & Peregrine, 1995; Garcia, et al., 2021)

El ganado resistente a las infecciones por trypanosomas desarrolla una respuesta inmune eficaz para controlar la parasitemia y ayudando a la reducción de los signos clínicos, mientras que los animales susceptibles desarrollan formas más severas de la enfermedad debido a una respuesta inmune limitada por lo que presentan mayores síntomas clínicos y una alta mortalidad (Boeira, et al., 2018).

Capítulo VI: Conclusiones

Las pruebas serológicas ELISA y aglutinación permitieron la detección de IgM e IgG, durante todo el tiempo de observación del donante, el cual se mantuvo sin tratamiento hasta el final de la observación (día 42).

El kit comercial CAAT/ *T. evansi* detectó IgM en los bovinos infectados desde el día 7 y 11 post infección, con niveles de aglutinación del 1 al 4.

Mediante el kit comercial CAAT/ *T. evansi* para la detección de IgM, se pudo evidenciar que los niveles de aglutinación en los bovinos tratados con cloruro de isometamidium y diaceturato de diminazeno descendieron a partir del día 18 y 29, respectivamente, no así el tratamiento con dipropionato de imidocarb que mantuvo un nivel de aglutinación fuerte hasta el final del estudio experimental, probablemente debido a que hubo re-infecciones.

Las IgG se observaron en los 3 tratamientos con varias oscilaciones representativas de las infecciones con *T. vivax*, durante todo el tiempo de observación.

Ambas pruebas serológicas pueden dar falsos positivos debido a las reacciones cruzadas que *T. vivax* puede presentar incluso entre especies taxonómicamente distantes, como lo que se observó en el ELISAi del control positivo presentó valores altos (mayores a 0.6) desde el día -1 por lo que la seropositividad es cuestionable.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda realizar la aplicación de la prueba ELISA utilizando los reactivos y equipos descritos según el manual de la OMSA para tener mejores resultados.

En el caso de cambiar los reactivos descritos en el manual de la OMSA, se recomienda estandarizar la prueba ELISA para establecer los nuevos parámetros y disponer las cantidades suficientes de reactivos.

Para el seguimiento serológico de una infección activa se recomienda usar al menos dos pruebas diagnósticas debido a la serología residual de larga duración.

Se recomienda aplicar las técnicas *CATT/T. evansi* y ELISA en animales infectados naturalmente para comparar la respuesta tanto de IgG e IgM.

Para la prueba serológica ELISA se recomienda la producción de los parásitos de la cepa nativa presente en Ecuador mediante el método descrito en el manual de la OMSA.

Bibliografía

- Betancur, O., Jimenez, P., & Giraldo, C. (2016). Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Veterinary Parasitology*, 229(1), 54-59.
- Abdala, A., Larriestra, A., & Signorini, M. (2020). Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Revista Veterinaria*, 31(2), 115.
- Aguilar, R., Silva, J. A., Schneider, R. C., Freitas, J., Mesquita, D., Mesquita, T., . . . Barbosa, M. E. (1996). outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 5(1), 561-562.
- Alhaji, M., & Farhana, A. (2022). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Anziani, O. (2010). *Mosca brava (Stomoxys calcitrans) (biología, importancia económica, aspectos epidemiológicos y tendencias estacionales en el área central de la Argentina, control)*. Obtenido de INTA: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-ficha-3_27-02.pdf
- Aronstein, W., Lewis, S., Norden, A., Dalton, J., & Strand, M. (1986). Molecular identity of a major antigen of *Schistosoma mansoni* which cross-reacts with *Trichinella spiralis* and *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 92(1), 133-151.
- Asghar, M. M., & Rassouli, M. (2022). First identification of *Trypanosoma vivax* among camels (*Camelus dromedarius*) in Yazd, central Iran, jointly with *Trypanosoma evansi*. *Parasitology International*, 86(1).
- Azeredo, T., Marques, A., Souza, A., De Carvalho, D., Beltrán, D., Nicaretta, J., . . . Zanetti, W. (2020). Comparison of therapeutic efficacy of different drugs against *Trypanosoma vivax* on experimentally infected cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 181, 105040.

- Baral, T. (2009). Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-24.
- Baral, T. N. (2010). Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Batista, J., Riet, F., Teixeira, M., Madruga, C., Simoes, S., & Maia, T. (2007). Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology*, 143(1), 174-181.
- Benfodil, K., Büscher, P., Abdelli, A., Van, N., Mohamed, A., Ansel, S., . . . Ait, K. (2020). Comparison of serological and molecular tests for detection of *Trypanosoma evansi* in domestic animals from Ghardaïa district, South Algeria. *Veterinary Parasitology*, 280.
- Betancur, O., Jimenez, P., & Giraldo, C. (2016). Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Veterinary Parasitology*, 229(1), 54-59.
- Betancourt, J. A., & Wells, E. A. (1979). Pérdidas económicas en un brote de tripanosomiasis bovina causada por *Trypanosoma vivax*. *Revista Acovez*, 3(9), 6-9.
- Birhanu, H., Fikru, R., Said, M., Kidane, W., Gebrehiwot, T., Hagos, A., . . . Büscher, P. (2015). Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, Northern Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 8(212), 1-11.
- Blandino, R., & Baumgarth, N. (2019). Secreted IgM: New Tricks for an Old Molecule. *106(5)*, 1021-1034.
- Boeira, P., Fortes, F., Garcia, G., Da Silva, M., Oliveira, C., Resende, E., . . . Ferreira, j. (2018). Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Experimental Parasitology*, 185(1), 98-106.

- Boulangé, A., Pillay, D., Chevtzoff, C., Biteau, N., Comé, V., Rempeters, L., . . . Baltz, T. (2017). Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. *Veterinary Parasitology*, 233(1), 32-38.
- Boulangé, A., Pillay, D., Chevtzoff, C., Biteau, N., Comé, V., Rempeters, L., . . . Baltz, T. (2017). Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. *Veterinary Parasitology*, 233(1), 32-38.
- Boulanger, N. (2018). Insect-Borne Pathogens and Skin Interface: Flagellate Parasites and Skin Interface. En *Skin and Arthropod Vectors* (págs. 193-238). Academic Press.
- Boxler, D. (Febrero de 2015). *NebGuide*. Obtenido de The Horn Fly: <https://entomology.unl.edu/livestock/hornfly.pdf>
- Cayla, M., Rojas, F., Silvester, E., Venter, F., & Matthews, K. (2019). African trypanosomes. *Parasites & Vectors*, 12(1), 190.
- Chávez, M. A., Medina, M., Cholota, C., Jumbo, J., Saegerman, C., Proaño, F., . . . Reyna, A. (2021). First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 2422-2428.
- Cox, F. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, 122(1), 23-38.
- Dagnachew, S., & Bezie, M. (2015). Review on *Trypanosoma vivax*. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 7(1), 41-64.
- Dagnachew, S., Terefe, G., Abebe, G., Barry, D., McCulloch, R., & Goddeeris, B. (2015). In vivo experimental drug resistance study in *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. *Acta Tropica*, 146(1), 95-100.
- Dávila, A., & Silva, R. (2006). Animal Trypanosomiasis in South America: Current Status, Partnership, and Information Technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 199-212.

- Desquesnes, M. (2004). *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. Paris: OIE.
- Desquesnes, M. (2017). *Compendium of Diagnostic Protocols of the OIE Reference Laboratory for Animal Trypanosomoses of African Origin*. Obtenido de https://www.woah.org/nttat/Attached%20files/A16-REC-COMPENDIUM_PROTOCOLES_TRYPANO-En.pdf
- Desquesnes, M., Bengaly, Z., & Dia, M. (2003). Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 56(3), 141-144.
- Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazman, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., . . . Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites & Vectors*, 15(64), 1-24.
- Desquesnes, M., Rocque, S., & Peregrine, A. (1995). French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* sistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride. *Acta Tropica*, 60(1), 133-136.
- Desquesnes, M., Sazmand, A., Gonzatti, M., Boulangé, A., Bossard, G., Thévenon, S., . . . Hébert, L. (2022). Diagnosis of animal trypanosomoses: proper use of current tools and future prospects. *Parasites & Vectors*, 15(235), 1-22.
- Dias, R., Azeredo, T. S., Heller, L. M., Monteiro, L. F., Beltrán, D. M., Cavalcante, A., . . . Zanetti, W. D. (2022). How many cattle can be infected by *Trypanosoma vivax* by reusing the same needle and syringe, and what is the viability time of this protozoan in injectable veterinary products? *Parasitology*, 149(2), 270-282.
- Duszynski, D., Kvičerová, J., & Seville, R. (2018). Chapter 18—Treatment and Drug Therapies of Coccidiosis in Carnivora. En *The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Carnivores of the World* (págs. 445-463). Academic Press.

- Dvm, A., & Rovid, S. (2018). African Trypanosomiasis. *The Center for Food Security & Public Health*, 1(1), 1-8.
- Eisler, M., Lessard, P., Masake, R., Moloo, S., & Peregrine, A. (1998). Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 79, 187-201.
- Eloi, O., Oliveira, L., Bezerra, M., Lopes, C., Aparecida, M., . . . Aparecida, G. (2017). Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(4), 516-520.
- Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, 14(1), 80.
- Fidelis, O., Sampaio, P., Gonçalves, L., André, M., Zacarias, R., Wijffels, G., & Cadioli, F. (2019). Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(2), 203-209.
- García, I., Muñoz, B., Aguirre, A., Polo, I., García, A., & Refoyo, P. (2008). Manual de laboratorio de Parasitología 2. Flagelados sanguíneos y tisulares. *Revista Reduca*, 1(2), 7-19.
- Garcia, K., Cruz, A., Fidelis, O., Beterquini, W., Rogério, M., Geraldés, M., . . . Cadioli, F. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 30(1), 1-12.
- Garcia, K., Da Cruz, A., Fidelis, O., Nagata, W., André, M., Geraldés, M., . . . Cadioli, F. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, 30(1), 1-12.

- Gardiner, P. R. (1989). Recent Studies of the Biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*, 28(1), 229-317.
- Giordani, F., Morrison, L., Rowan, T., De Koning, H., & Barrett, M. (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 143(14), 1862-1889.
- Gomide, G., Lopes, L., Teixeira, A., Santos, M., Ferreira, Á., Steindel, M., . . . Toshio, R. (2021). A recombinant protein (MyxoTLm) for the serological diagnosis of acute and chronic *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 296.
- Gomide, G., Lopes, L., Teixeira, A., Santos, M., Ferreira, Á., Steindel, M., . . . Toshio, R. (2021). A recombinant protein (MyxoTLm) for the serological diagnosis of acute and chronic *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 296.
- Gutiérrez, H., & Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Graw Hill.
- Hailu, M., Endale, G., & Gemed, L. (2019). Review on Diagnostic Methods of Trypanosomosis. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 11(3), 1-5.
- Hailu, M., Endale, G., & Gemed, L. (2019). Review on Diagnostic Methods of Trypanosomosis. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 11(3), 1-5.
- Hilali, M., Abdel, A., Nassar, A., Magnus, E., & Büscher, P. (2004). Evaluation of the card agglutination test (CATT/*T. evansi*) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Veterinary Parasitology*, 121(1), 45-51.
- Inojosa, W., Augusto, I., Bisoff, Z., Josenado, T., Abel, P., Stich, A., & Whitty, C. (2006). Diagnosing human African trypanosomiasis in Angola using a card agglutination test: Observational study of active and passive case finding strategies. *BMJ : British Medical Journal*, 332(7556), 1-5.
- INTA EEA. (2012). *Tábanos*. Obtenido de Grupo de Ecología de Poblaciones de Insectos INTA EEA: https://www.produccion-animal.com.ar/fauna/Fauna_insectos/07-tabanos.pdf

- Jackson, A., Goyard, S., Xia, D., Foth, B., Sanders, M., Wastling, J., . . . Berriman, M. (2015). Global Gene Expression Profiling through the Complete Life Cycle of *Trypanosoma vivax*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), 1-29.
- Kakundi, E. (2008). *Molecular analysis of the congopain gene family*. Pietermaritzburg.
- Magez, S., Pinto, J., Obishakin, E., & Radwanska, M. (2020). Infections With Extracellular Trypanosomes Require Control by Efficient Innate Immune Mechanisms and Can Result in the Destruction of the Mammalian Humoral Immune System. *Frontiers in Immunology*, 11(382), 1-19.
- Magez, S., Pinto, J., Oh, S., & Radwanska, M. (2021). Salivarian Trypanosomes Have Adopted Intricate Host-Pathogen Interaction Mechanisms That Ensure Survival in Plain Sight of the Adaptive Immune System. *Pathogens*, 10(6), 679.
- Monteiro, L. F., Maffini, L., Beltrán, D. M., Moura, M., Lage, G., Souza, A., . . . Zanetti, W. (2022). Presence of *Trypanosoma vivax* DNA in cattle semen and reproductive tissues and related changes in sperm parameters. *Veterinary Parasitology*, 309(1).
- Murphy, N., Cardinal, V., Bhattacharyya, T., Enriquez, G., Macchiaverna, N., Alvedro, A., . . . Miles, M. (2021). Assessing antibody decline after chemotherapy of early chronic Chagas disease patients. *Parasites & Vectors*, 14(543), 1-12.
- Nok, A. (2009). Chapter 62 - African Trypanosomiasis. En A. Barrett, & L. Stanberry, *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* (págs. 1255-1273). Academic Press.
- OIE. (2018). *Manual Terrestre de la OIE*. Obtenido de https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.16_TRYPANOSOMOSIS.pdf
- Orbe, D., & Cuichán, M. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. Retrieved from INEC: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/webinec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2021/Bolet%C3%ADn%20t%C3%A9cnico.pdf

- Ortega, H., Ron, J., Reyna, A., & Chavez, M. A. (2014). Primer reporte e identificación molecular de *Trypanosoma vivax* en bovinos del Ecuador. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*.
- Osório, A. L., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Rios, L., & Gonçalves da Costa, S. (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.
- 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(2253), 1-20.
- Ramírez, R., Angulo, F., Gil, M., Parra, O., Tavares, L., Holzmüller, P., . . . Reyna, A. (2015). Respuesta inmunitaria de ovinos (*Ovis aries*) frente a dos aislados Venezolanos de *Trypanosoma vivax*. *Revista Científica*, 25(5), 361-367.
- Ramirez, R., Reyna, A., Parra, O., Valeris, R., Tavares, L., Brizard, J. P., . . . Holzmuller, P. (2019). *Trypanosoma vivax* infection in sheep: Different patterns of virulence and pathogenicity associated with differentially expressed proteomes. *Veterinary Parasitology*, 276(1), 1-14.
- Ramirez, R., Reyna, A., Parra, O., Valeris, R., Tavares, L., Brizard, J. P., . . . Holzmuller, P. (2019). *Trypanosoma vivax* infection in sheep: Different patterns of virulence and pathogenicity associated with differentially expressed proteomes. *Veterinary Parasitology*, 276(1), 1-14.
- Reck, C., Menin, Á., Batista, F., Oliveira, P., & Miletti, L. (2021). Evaluation of buffered *Trypanosoma evansi* antigen and rapid serum agglutination test (BA/Te) for the detection of anti-*T. evansi* antibodies in horses in Brazil. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 1(1), 1-4.

- Reyna, A., Eleizalde, M., & Silva, A. (2007). Assessment of Chromogen Suitability in ELISA for the Detection of Anaplasmosis and trypanosomosis. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 28(1), 1-11.
- Reyna, A., García, F., Rivera, M., Sánso, B., & Aso, P. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Veterinary Parasitology*, 80(1), 149-157.
- Richards, S., Morrison, L., Torr, S., Barrett, M., Manangwa, O., Mramba, F., & Auty, H. (2021). Pharma to farmer: Field challenges of optimizing trypanocide use in African animal trypanosomiasis. *Trends in Parasitology*, 37(9), 831-843.
- Rodrigues, C., Garcia, H., Rodrigues, A., Costa-Martins, A., Pereira, C., Pereira, D., . . . Teixeira, M. (2017). New insights from Gorongosa National Park and Niassa National Reserve of Mozambique increasing the genetic diversity of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma vivax*-like in tsetse flies, wild ungulates and livestock from East Africa. *Parasites & Vectors*, 10(337).
- Rodríguez, N. (2011). *Epidemiología clínica y molecular de la tripanosomosis animal por Trypanosoma evansi en Canarias*. Tesis Doctoral.
- Schroeder, H., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(202), 41-52.
- Seidl, A., Dávila, A., & Silva, R. (1999). Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 269-272.
- Sekoni, V. O. (1994). Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A review. *Theriogenology*, 42(4), 557-570.
- Sellon, D. (2007). CHAPTER 61 - Miscellaneous Parasitic Diseases. En D. Sellon, & M. Long, *Equine Infectious Diseases* (págs. 473-480). Saunders.

- Seyoum, W., Tora, E., Kore, K., & Lejebo, F. (2022). Seasonal Patterns: Bovine trypanosomosis, *Glossina pallidipes* Density, and Infection in Rift Valleys of Gamo Zone, Southern Ethiopia. *Frontiers in Veterinary Science*, 1(1), 1-13.
- Shivam, S., EL-Matbouli, M., & Kumar, G. (2021). Kinetics of Parasite-Specific Antibody and B-Cell-Associated Gene Expression in Brown Trout, *Salmo trutta* during Proliferative Kidney Disease. *Biology*, 10, 1-17.
- SIPA. (2021). *Indicadores sectoriales*. <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/indicador-agroeconomico>
- Suárez, C., García, F., Román, D., Coronado, A., Perrone, T., Reyna, A., & Parra, N. (2009). Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 27(4), 363-372.
- Suárez, C., García, F., Román, D., Coronado, A., Perrone, T., Reyna, A., & Parra, N. (2009). Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 27(4), 363-372.
- Tamasaukas, R., Tamasauskas, C., Cobo, M., & Rivera, S. (2017). Evaluación en campo de un ELISA indirecto, desarrollado con productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina. Fases: I-Preparación y rendimiento de los antígenos, y II-Validación del Ac-ELISA h. *Maskana*, 8, 29-35.
- Tehseen, S., Jahan, N., Qamar, M. F., Desquesnes, M., Shahzad, M. I., Deborggraeve, S., & Philippe, B. (2015). Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasites & Vectors*, 415(8).
- Tizard, I. (2009). *Veterinary Immunology*. Barcelona: Elsevier.
- Uzcanga, G., Mendoza, M., Aso, P., & Bubis, J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*, 124(3), 287-299.

- Uzcanga, G., Pérez, Y., Camargo, R., Izquier, A., Noda, J., Chacín, R., . . . Bubis, J. (2016). Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma* (Duttonella) vivax parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. *Veterinary Parasitology*, 218(1), 31-42.
- Uzcanga, G., Perrone, T., Noda, J., Pérez, J., Medina, R., Hoebeke, J., & Bubis, J. (2004). Surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochemistry*, 43(3), 595-606.
- Vásconez, L. (22 de Noviembre de 2017). Las reses mueren en Chone por la tripanosomiasis. *El Comercio*.
- Wells, E. A., Betancourt, A., & Page, W. A. (1970). The epidemiology of bovine trypanosomiasis in Colombia. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2(1), 111–125.
- Wells, E. A., Betancourt, A., & Ramirez, L. E. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1(5), 448-449.
- Zanette, M., Felix, V., Laurenti, M., Rossi, C., Vides, J., Costa, R., . . . Marcondes, M. (2013). Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.

Apéndices