



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS
CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE
LOS TSÁCHILAS”**

Realizado por:

MARÍA ALEJANDRA BURGOS CHÁVEZ

Director del proyecto:

Ph.D José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

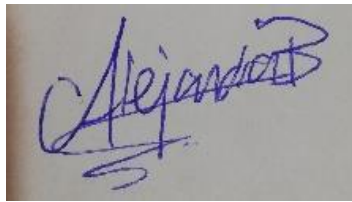
Quito, 25 de junio del 2021

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, MARÍA ALEJANDRA BURGOS CHÁVEZ, con cédula de identidad # 1721071791, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



FIRMA

1721071791

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS
CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE
LOS TSÁCHILAS”**

Realizado por:

MARÍA ALEJANDRA BURGOS CHÁVEZ

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor


FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO

LINO ARISQUETA HERRANZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 25 de Junio del 2021

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

Biodiversidad y Recursos Naturales aplicados a la Gestión Ambiental y la Biotecnología

y bajo el proyecto de investigación aprobado por la dirección de investigación, titulado:

Determinación de la seroprevalencia de tripanosomosis causada por *Trypanosoma spp.* en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

DEDICATORIA

A mi principal fortaleza, mi abuelito Víctor Chávez, que siempre creyó en mí, por cada consejo de vida que me has dado, te dedico porque sé que tu sueño era verme graduada como profesional, sé que me acompañas en este momento tan especial de mi vida y estás orgulloso de mí, mis padres, quienes me han apoyado siempre incondicionalmente y han sido mi objetivo a seguir. A mi abuelita Luz Emilia, quien ha sido gran compañía en cada momento de mis etapas, puedo decir plenamente que además de mi abuela, eres mi segunda madre.

AGRADECIMIENTO

A mis padres, Luis y Natalia, por darme la oportunidad de culminar mis sueños y metas. A mi tutor de tesis Rubén, por enseñarme, apoyarme siempre compartir sus conocimientos para crecer a nivel profesional, a mi familia por confiar en mí y ser mi más grande motivación.

**“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”**

Para someter a:

To be submitted:

Alejandra Burgos¹, Juan Carlos Navarro Castro¹,

José Rubén Ramírez Iglesias^{1*}

**“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS
CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE
LOS TSÁCHILAS”**

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador. 25/06/2021

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: Ph.D José Rubén Ramírez,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-9-86391273; email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

RESUMEN

En América Latina, la tripanosomosis es una enfermedad hemoparasitaria que afecta negativamente a animales de interés pecuario y es causada principalmente por las especies de protozoarios *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*. Ecuador posee una información epidemiológica limitada tanto a nivel de pruebas de detección de tamizaje como de diagnóstico, a pesar de poseer condiciones ambientales adecuadas para la presencia de la tripanosomosis y de ubicarse en una región en la cual la enfermedad tiene carácter endémico. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia de la tripanosomosis en una provincia de la región costa de Ecuador, por medio del Ensayo Inmunoenzimático Indirecto (ELISAI). El ELISAI fue estandarizado en el laboratorio para detectar anti cuerpos circulantes IgG anti *Trypanosoma spp.* y se evaluó un total de 100 sueros bovinos provenientes de 9 parroquias de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Las condiciones analíticas que mostraron la mayor diferencia cuantitativa entre sueros negativos y positivos en el inmunoensayo fueron: dilución 1/400 de suero, dilución 1/10000 del conjugado anti IgG de bovino y 15 minutos de incubación / agitación para la lectura del revelado. Se determinó una seroprevalencia general del 8 % (8/100), dentro de la cual los sueros de las parroquias Chiguilpe, Valle Hermoso, El Esfuerzo, Alluriquín y Santo Domingo presentaron anticuerpos IgG anti *Trypanosoma spp.*, con seroprevalencias específicas de 33.3% (1/3), 18,8% (3/16), 9,1% (1/11), 6,7% (1/15) y 3,9% (1/26), respectivamente. La seropositividad encontrada en Santo Domingo de los Tsáchilas indica la posible presencia del agente infeccioso en rebaños bovinos de la región costa del país, lo cual se presenta como un riesgo para todos los animales tanto domésticos de producción pecuaria, como silvestres. Esto muestra la necesidad de ampliar el rango de aplicación de la prueba de tamizaje a otras provincias, para establecer el riesgo en otras localidades e implementar pruebas directas de detección, con el objetivo de establecer la verdadera situación de la enfermedad.

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

.

Palabras clave: ELISAi, seroprevalencia, tripanosomosis, *Trypanosoma spp.* *Trypanosoma vivax*,
Trypanosoma evansi.

ABSTRACT

In Latin America, trypanosomosis is a hemoparasitic disease that adversely affects livestock and is caused mainly by the protozoan species *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. Ecuador has limited epidemiological information on both screening and diagnostic tests, despite having adequate environmental conditions for the presence of trypanosomosis and being located in a region where the disease is endemic. Therefore, the objective of this study was to determine the seroprevalence of trypanosomosis in a province of the coastal region of Ecuador, by means of the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA). The iELISA was standardized in the laboratory to detect IgG anti *Trypanosoma spp.* circulating antibody and a total of 100 bovine sera from 9 parishes of the province of Santo Domingo de los Tsáchilas were evaluated. The analytical conditions that showed the greatest quantitative difference between negative and positive sera in the immunoassay were: 1/400 dilution of serum, 1/10000 dilution of the bovine anti IgG conjugate and 15 minutes of incubation/agitation for reading the development. An overall seroprevalence of 8% (8/100) was determined, within which sera from Chiguilpe, Valle Hermoso, El Esfuerzo, Alluriquín and Santo Domingo parishes presented IgG antibodies against *Trypanosoma spp.* with specific seroprevalences of 33.3% (1/3), 18.8% (3/16), 9.1% (1/11), 6.7% (1/15) and 3.9% (1/26), respectively. The seropositivity found in Santo Domingo de los Tsáchilas indicates the possible presence of the infectious agent in cattle herds in the coastal region of the country, which presents a risk for all domestic livestock and wild animals. This shows the need to expand the range of application of the screening test to other provinces, to establish the risk in other localities and implement direct detection tests, in order to establish the true situation of the disease.

Keywords: iELISA, seroprevalence, trypanosomosis, *Trypanosoma spp.* *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi*.

1. INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis es considerada una enfermedad desatendida en el Ecuador, causada por parásitos protozoarios hemoflagelados del género *Trypanosoma*, con capacidad de afectar un amplio rango de mamíferos tanto de vida doméstica como silvestre en las regiones tropicales y subtropicales, lo cual incide negativamente en la productividad de las actividades pecuarias y limita severamente su desarrollo. Según la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades desatendidas son aquellas que se encuentran en zonas rurales de escasos recursos en países de desarrollo, los cuales son vulnerables a la falta de apreciación de gravedad por parte del gobierno e instituciones sanitarias. La enfermedad se encuentra principalmente en lugares con ambientes cálidos, tropicales y generalmente son transmitidas por vectores (Organización Mundial de la Salud, 2010; Chávez-Larrea et al., 2020).

En América Latina, la tripanosomosis es producida especialmente por las especies *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. Tanto *T. evansi* como *T. vivax* son mecánicamente transmitidos en Centro y Suramérica por moscas hematófagas dípteras, como *Tabanus sp.*, *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans* (Osorio et al., 2008; Oliveira et al., 2009; Magez & Radwanska, 2014). *T. vivax* es un hemoprotoso que afecta a los rebaños bovinos en África y América Central y del Sur, siendo una de las especies patógenas más importantes (García et al., 2016). Comúnmente se denomina Nagana en África y " secadera / cachera / cacho hueco / huequera " en varios países de América del Sur (Gonzatti et al., 2014). Este hemoparásito es endémico de Brasil a Costa Rica, incluidos Colombia, Venezuela, Perú, Bolivia, Panamá y Paraguay (Batista et al., 2009; Desquesnes, 2004; García et al., 2005; Gonzatti et al., 2014; Ramírez-Iglesias et al., 2017; Jones & Dávila, 2001).

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

Por otra parte, *T. evansi* es un importante parásito extracelular que causa enfermedades en muchos países africanos, asiáticos y sudamericanos. Esta enfermedad principalmente afecta a caballos y camellos, pero también se ve afectado una amplia variedad de mamíferos domésticos y silvestres como bovinos, búfalos, rumiantes, entre otros (Desquesnes, 2004; Holzmuller et al., 2013; Ramírez-Iglesias et al., 2017). En América del Sur la tripanosomosis equina es conocida como Derrengadera o Mal de Caderas (Parra et al., 2019). *T. evansi* ha sido reportado en 48 países; en gran parte confinado a países de África y Asia, en contraste con siete países de América del Sur, y cuatro en Europa, en los cuales el parásito ha importado por medio de animales infectados (Aregawi et al., 2019).

El ganado infectado con *Trypanosoma spp.* presenta sintomatología en cursos agudos y subagudos, principalmente fiebre, anemia severa, debilidad, deterioro de la condición corporal, pérdida de apetito, hipoproteinemia, emaciación, incoordinación, alteraciones en el sistema de la coagulación sanguínea, diarrea, aborto, inmunosupresión y diversos síntomas neurológicos, desórdenes reproductivos hasta que las complicaciones lo llevan a la muerte (Cadioli et al., 2015). La enfermedad suele darse con mayor gravedad en individuos inmunodeficientes y en hospedadores que no han tenido contacto previo con el parásito; del mismo modo se ha demostrado trombocitopenia, formación de microtrombos y hemorragia sugestiva de coagulación intravascular diseminada (Batista et al., 2009; Desquesnes, 2004; Gutierrez et al., 2006). Los animales que sobreviven pueden volverse reservorios de la enfermedad, aunque factores ambientales podrían inducir el aumento de la parasitemia y la reaparición de los signos clínicos (Gonzatti et al., 2014). De forma específica, *T. vivax*, puede causar desnutrición, abortos, infertilidad, entre otros (Taylor, 2004), mientras que *T. evansi* puede generar anomalías hemostáticas (Desquesnes, Holzmuller, et al., 2013; Mekata et al., 2013).

Existen distintos métodos de diagnóstico para la detección de los agentes causales de la tripanosomosis en los animales infectados. Los métodos parasitológicos se realizan mediante la observación directa del parásito bajo el microscopio óptico, cuya aplicación es adecuada cuando existe una parasitemia elevada, pero tienen baja sensibilidad. Los métodos moleculares se basan en amplificación del material genético, ADN o ARN, del agente infeccioso, estos ensayos tienen una alta sensibilidad y especificidad con la capacidad de distinguir diferentes especies (Dávila et al., 2003; Cañavate et al., 2009; Ramírez-Iglesias et al., 2011). Los métodos inmunológicos como el ensayo inmuno-enzimático (ELISA por sus siglas en inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) se basan en la detección de antígenos (Ag-ELISA) o anticuerpos (indirecto-ELISA o ELISAI) relacionados con el agente causal de la enfermedad. Concretamente, el ELISAI tiene una alta sensibilidad, aunque puede presentar una baja especificidad, debido al fenómeno de la reactividad cruzada entre proteínas de la superficie de la membrana plasmática en especies de parásitos pertenecientes al género *Trypanosoma*. Esta reactividad cruzada está atribuida a las glicoproteínas variables de superficie (VSG), las cuales permiten que los parásitos salivarios evadan al sistema inmunitario adaptativo del hospedador mediante una amplia variación antigénica, para evitar su eliminación (Monzón et al., 2010; Ramírez-Iglesias et al., 2011; Uzcanga et al., 2016).

Para el análisis serológico se incluyen métodos de diagnóstico como el ensayo inmunoenzimático indirecto con extractos crudos antígenos derivados de *Trypanosoma spp* (Ramírez-Iglesias et al., 2011; Uzcanga et al., 2016). Dichas pruebas serológicas detectan anticuerpos inmunoglobulina G (IgG) cuando el organismo presenta o ha presentado una infección (Desquesnes et al., 2013). Sin embargo, el problema de este método serológico es que no discrimina entre infecciones recientes o pasadas, y su falta de especificidad (Cañavate et al., 2009).

La tripanosomosis presentan una amplia distribución y característica endémica en varios países del continente como Venezuela, Brasil, Colombia, Perú (Desquesnes, 2004). Sin embargo, en Ecuador se han realizado escasos estudios sobre la situación de la patología causada por *Trypanosoma spp.* Se han publicado estudios limitados con respecto a la seroprevalencia de esta enfermedad. El estudio pionero de seropositividad a nivel nacional fue reportado en 1977 (Wells et al., 1977). En la provincia de Manabí, ubicada en la región Costa del Ecuador, se ha encontrado la presencia de un brote de tripanosomosis bovina, siendo el primer reporte en identificación y caracterización de la especie de *Trypanosoma* causante de la enfermedad (Chávez-Larrea et al., 2020). En un segundo estudio, se registran casos de tripanosomosis en el oriente ecuatoriano, utilizando la técnica del ELISAI (Medina-Naranjo et al., 2017). Por lo tanto, en esta investigación se planteó determinar la seroprevalencia de la tripanosomosis en una población de bovinos de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, mediante la técnica serológica del ELISAI.

2. MÉTODOS

Muestreo

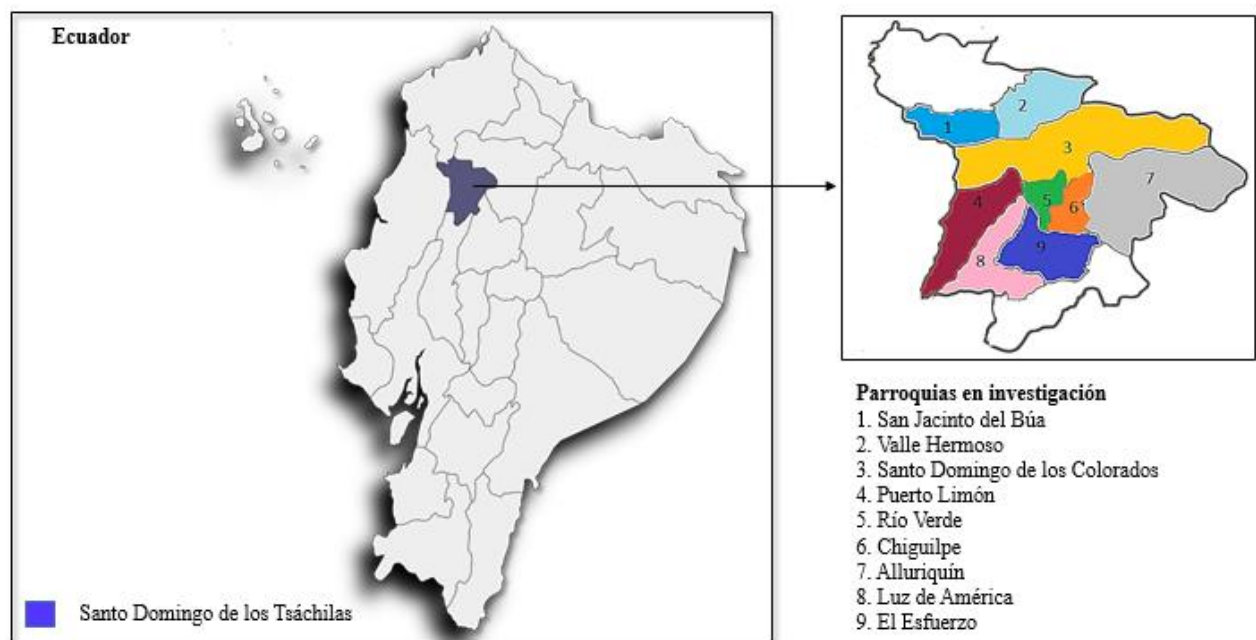
Las muestras evaluadas en este estudio fueron proporcionadas por el Centro de Investigación en Zoonosis – CIZ de la Universidad Central del Ecuador, y obtenidas durante la ejecución de la Encuesta Seroepidemiológica de Brucelosis, efectuada durante el año 2012. La población en estudio constó de un total de 100 sueros bovinos, pertenecientes a las siguientes parroquias: Alluriquín, Chiguilpe, El esfuerzo, Luz de América, Santo Domingo de los colorados, Puerto Limón, Río Verde, Valle Hermoso, San Jacinto del Búa, ubicadas en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (0°20'00"S 79°15'00"O) a una altitud promedio

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

de 625 m.s.n.m. (Figura1).

De acuerdo a los datos de ganadería tomados en el año 2019 por el Instituto Nacional de Estadística y Censos, el número de cabezas de ganado vacuno en la región Costa es de 1.710.130, mientras que la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas presenta una población de 139.036 aproximadamente, siendo el 3,37% de la población ganadera nacional (ESPAC, 2016; Sánchez et al., 2019).

Figura 1. Localización geográfica del área de investigación en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. Se muestran las parroquias en estudio.



Preparación del extracto antigénico clarificado

Se empleó el aislado venezolano de *Trypanosoma equiperdum* TeAp-N/D1 obtenido de un equino infectado del estado Apure, Venezuela, y caracterizado molecularmente por (Sánchez et al., 2015). El procedimiento para la generación del extracto antigénico se basó en el protocolo

establecido por (Uzcanga et al., 2002). De forma general, los parásitos *T. equiperdum* (10^9), previamente purificados, fueron sonicados en hielo (6 pulsos de 30 segundos al 40% de intensidad y amplitud con un descanso de 30 segundos cada uno) usando 600 μ L de 5 mM buffer Tris-HCl (pH 7.2) en presencia de un coctel de inhibidores proteolíticos. El homogenato resultante se centrifugó a 15000 g por 20 minutos a 4 °C para obtener las fracciones de sobrenadante y pellet. El sobrenadante se usó como fuente de antígeno y se definió como el extracto antigénico clarificado de *T. equiperdum*. Posteriormente, se determinó la concentración de proteínas del extracto antigénico clarificado, por espectrofotometría, usando el equipo Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, USA), según el protocolo descrito por la casa comercial.

Estandarización del Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI)

Mediante el proceso de estandarización, se establecieron las condiciones óptimas del ELISAI para la detección de anticuerpos IgG anti *Trypanosoma spp.* en las muestras séricas de bovinos. Para ello, se emplearon 12 sueros negativos de referencia, provenientes de bovinos en buen estado de salud, previamente evaluados por PCR para determinar su negatividad a *T. evansi* y *T. vivax*, procedentes de la provincia de Imbabura (ubicada a más de 2500 m.s.n.m. en la región Sierra) y de zonas no endémicas a tripanosomosis de Venezuela. Adicionalmente, se utilizaron 2 sueros de referencia de animales positivos por PCR a *T. vivax*, procedentes de Venezuela. Se evaluaron dos condiciones de dilución de suero (1/200, 1/400) y del anticuerpo secundario anti-IgG -bovino conjugado con peroxidasa (1/10000, 1/20000), junto con la lectura de densidad óptica a 405nm (OD_{405}) del revelado en tres tiempos diferentes (15, 30 y 45 minutos). Las condiciones seleccionadas fueron aquellas que permitieron establecer la mayor diferencia de OD_{405} entre muestras positivas y negativas.

Implementación del ELISAI

El protocolo de ELISAI fue establecido según lo descrito por (Uzcanga et al., 2002; Ramírez-Iglesias et al., 2011) con ciertas modificaciones. Las placas de 96 pozos de polivinilo fueron sensibilizadas con 100 µl/pozo del extracto antigénico clarificado (20 µg/ml) diluido en 50 mM de buffer carbonato-bicarbonato (pH 9,6) durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. A continuación, se colocaron 200 µl/pozo de una solución de bloqueo que consiste en leche de soya en polvo al 5% diluida en PBS (pH 7,2). Luego, se añadieron 100 µl/pozo de suero de bovino diluido en buffer PBS-T, por duplicado, para evaluar las muestras de campo. Se agregaron 100 µl/pozo de conjugado anti-IgG de cabra anti -bovino diluido en buffer PBS-T. Entre cada paso se llevaron a cabo 5 lavados con 200 µl/pozo de 150 mM NaCl, 0,05% de Tween 20. Las incubaciones se realizaron durante 1 hora en una cámara húmeda a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 100 µl/pozo del cromógeno 2% ABTS (ácido 2,2'-azinobis- (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico)) diluido en tampón fosfato-citrato 0,05 M, se añadió H₂O₂ al 50% y se agitó a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la OD₄₀₅ con un lector de placas de ELISA, a temperatura constante de 23°C. Por cada placa se utilizaron seis sueros para controles negativos y dos sueros para controles positivos, para establecer el punto de corte por ensayo.

Para el tamizaje serológico, el punto de corte se estableció como la media más 3 veces la desviación estándar (X+3SD) obtenida a partir de las lecturas a OD₄₀₅ de los sueros de referencia negativos.

Para evaluar los parámetros de calidad del ensayo se utilizó el coeficiente de variación (CV) para estimar la variación estadística de la media entre las réplicas: interensayo para observar la reproducibilidad e intraensayo para la repetibilidad. Se estableció un $CV \leq 10\%$ para considerar ensayos o muestras con resultados válidos tanto para interensayo como intraensayo.

Determinación de la seroprevalencia

El porcentaje de seroprevalencia a partir del ELISAI en este estudio se calculó mediante la Ecuación (1) (Ramírez-Iglesias et al., 2011)

$$\text{Seroprevalencia} = \frac{\text{NPS}}{\text{TNS}} * 100 (\%) \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

- NPD es el número de muestras detectadas como positivas con la técnica
- TNS es el número total de muestras analizadas con la técnica.

Análisis estadístico

Se empleó una distribución t de Student para evaluar y comparar las medias de las lecturas a OD₄₀₅ de sueros positivos y negativos. Las diferencias de medias de los sueros analizados se consideraron estadísticamente significativas al presentar valores de $p < 0,05$. Los intervalos de confianza al 95% (95 % CI) y las pruebas de significancia se determinaron empleando las calculadoras en línea de bloc de gráficos de cálculos (Graph Pad) (*Software GraphPad*, n.d.).

3. RESULTADOS

Estandarización e implementación del ELISAI

Se procedió a determinar las condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica y el análisis de las muestras obtenidas. En la figura 2, se puede observar las OD₄₀₅ que se obtuvieron mediante los ensayos respectivos del ELISAI para el proceso de estandarización con dilución de conjugado 1/10000 y dilución de suero (1/200, 1/400). Se registraron en sueros negativos valores máximos de OD₄₀₅ de 0,553, 0,971, 1,349 con la dilución 1/200, y OD₄₀₅ de 0,265, 0,466, 0,648 con dilución 1/400, a los 15, 30 y 45 minutos respectivamente. Por otra parte, los valores mínimos de OD₄₀₅ fueron de 0,199, 0,345,

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

0,471 con dilución 1/200, y OD₄₀₅ de 0,109, 0,183, 0,253 con dilución 1/400 a los tiempos anteriormente mencionados. En relación a los resultados de los sueros positivos, la OD₄₀₅ aumenta hasta llegar al punto máximo de 4.00, registrado por el lector de ELISA, en los tiempos de revelado de 30 y 45 minutos. Por lo tanto los valores pierden la linealidad de las lecturas, reduciendo así su confiabilidad.

Con relación a las diferencias entre las OD₄₀₅ de sueros positivos y negativos a las distintas diluciones probadas, se puede observar que en la dilución 1/200, hay una menor diferencia (6,6247) en comparación con la dilución 1/400 (12,8125). Con respecto al conjugado, se optó por la dilución 1/10000 debido a que a una dilución de conjugado de 1/20000 se generaban OD₄₀₅ muy bajas (data no mostrada).

A partir de estos resultados, se definieron como condiciones estandarizadas para el ELISAi la dilución de suero de 1/400 y de conjugado de 1/10000, con tiempo de revelado de 15 minutos.

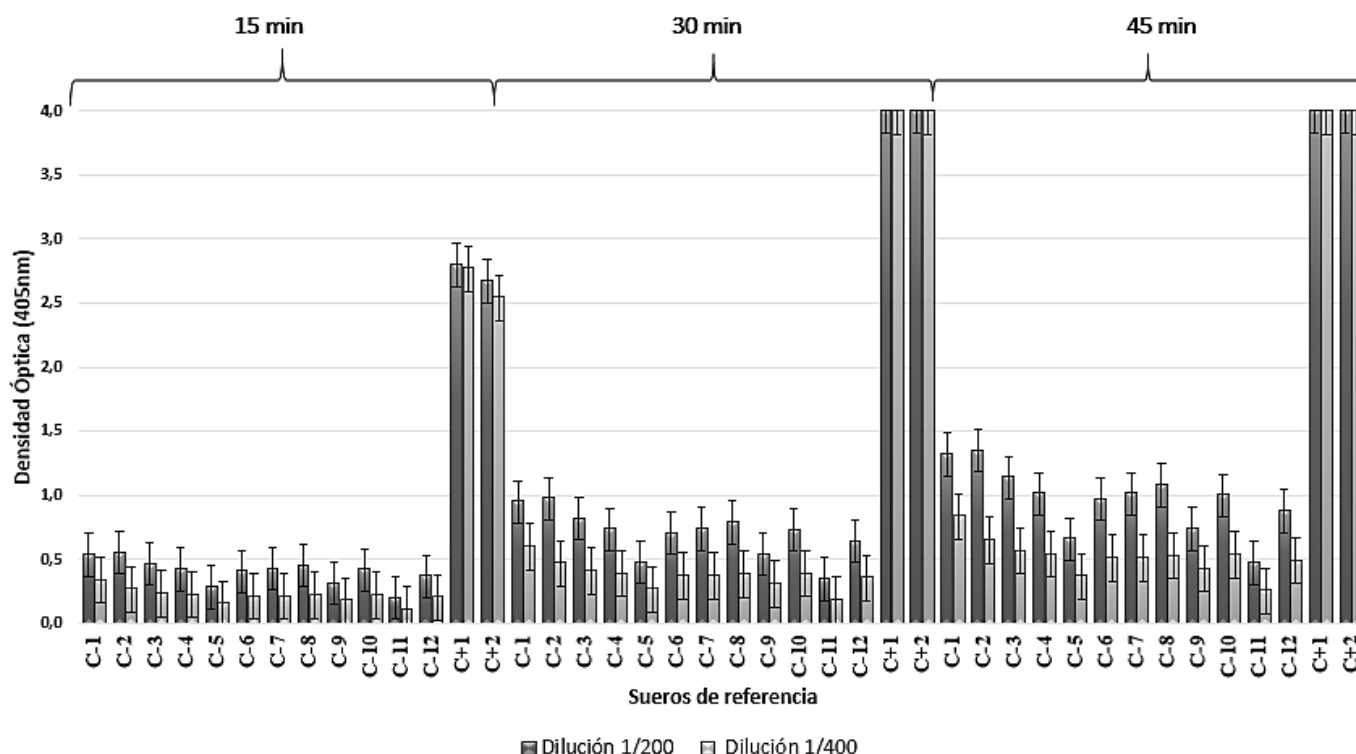
Tabla 1: Diferencia de los controles positivos y negativos con dilución 1/200 de suero y conjugado 1/10000, a 15, 30 y 45 minutos de lectura

Dilución 1/200	Tiempo (minutos)		
	15 min	30 min	45 min
Promedio control negativo	0,4028	0,7019	0,9675
Promedio control positivo	2,6687	4,0000	4,0000
Diferencia de controles	6,6247	5,6992	4,1345

Tabla 2: Diferencia de los controles positivos y negativos con dilución 1/400 de suero y conjugado 1/10000, a 15, 30 y 45 minutos de lectura

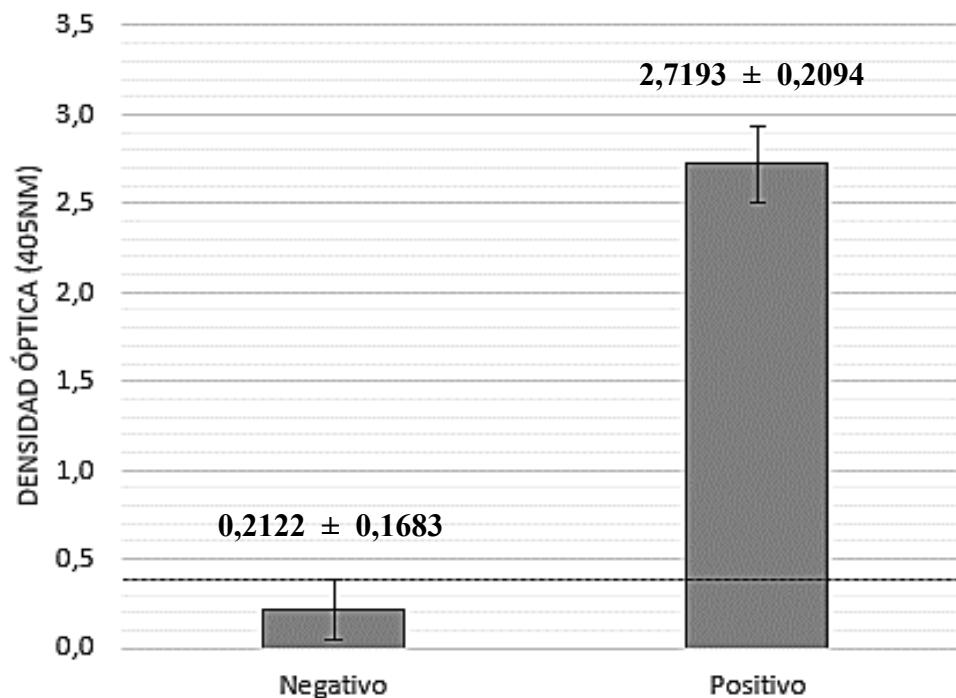
Dilución 1/400	Tiempo (minutos)		
	15 min	30 min	45 min
Promedio control negativo	0,2122	0,3727	0,5163
Promedio control positivo	2,7193	4,0000	4,0000
Diferencia de controles	12,8125	10,7324	7,7472

Figura 2. Estandarización del ELISAI: Diluciones de suero 1/200 y 1/400 a los 15, 30 y 45 minutos con sus respectivas desviaciones estándar.



Una vez obtenidas las condiciones óptimas de trabajo, se procedió a establecer el punto de corte por medio de las OD₄₀₅ de los sueros de referencia analizados previamente. La media (X) de los sueros control negativo fue 0,2122 y su desviación estándar (DS) fue 0,05610, por consiguiente, el punto de corte se determinó (valor de X+ 3 DS) con un resultado de 0,3805. En la figura 3, las barras representan la media $\pm$ 3 desviaciones estándar, de sueros de referencia negativos ($0,2122 \pm 0,1683$) y positivos ($2,7193 \pm 0,2094$). Se puede apreciar que las diferencias son estadísticamente significativas, lo cual permite distinguir claramente sueros positivos de los negativos, con una diferencia de 2,5071 de OD₄₀₅ entre los distintos grupos.

Figura 3. Establecimiento del punto de corte para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma spp.* por ELISAI. Medias de sueros de referencia: positivos y negativos $\pm$ la desviación estándar. El punto de corte (---) es 0.3805



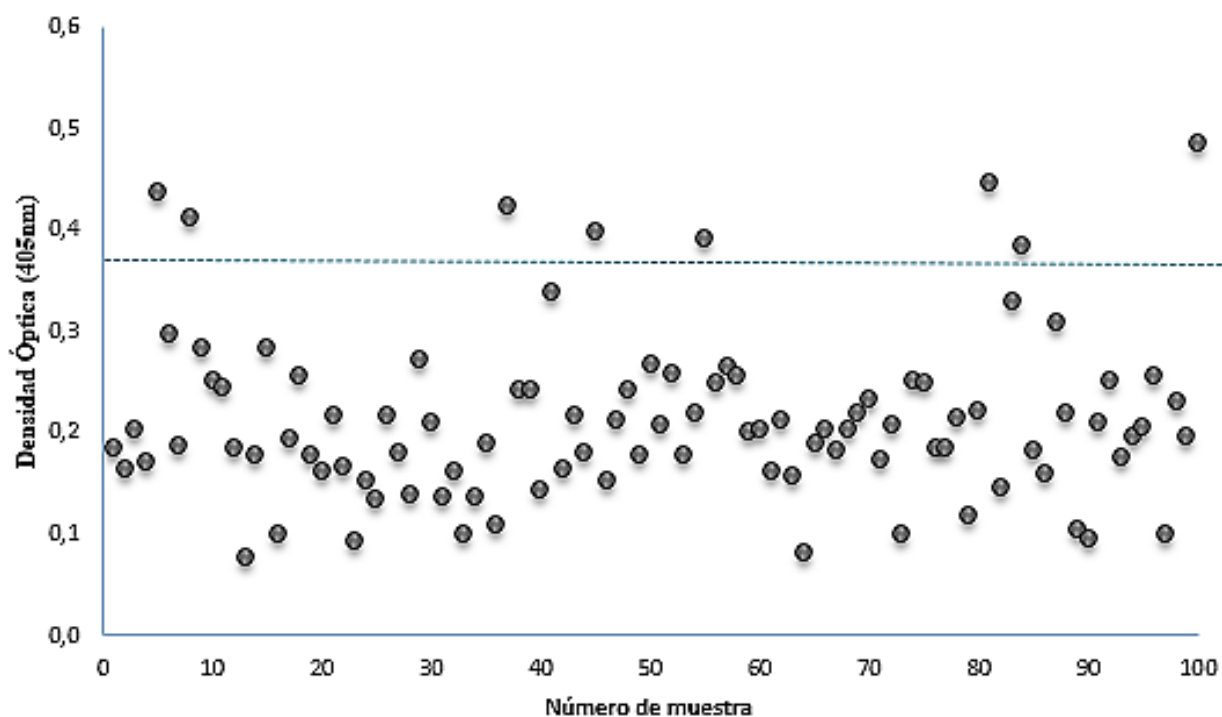
Determinación de seroprevalencia de tripanosomosis bovina

Una vez determinadas las condiciones óptimas de reacción, así como también el punto de corte, se realizó el análisis de las OD₄₀₅ de una población de 100 muestras de sueros bovinos aplicando la técnica ELISAI. Para la implementación del tamizaje serológico en este estudio se estableció que, los valores OD₄₀₅ superiores al punto de corte establecido en la estandarización del ensayo, son considerados como positivos mientras que los valores inferiores a 0,3805 son catalogados como negativos. En la figura 4, se determinaron los valores de OD₄₀₅ para cada uno de los sueros evaluados, a partir de las cuales 8 muestras mostraron un resultado positivo a la presencia de

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

anticuerpos IgG anti *Trypanosoma spp.*, es decir, se obtuvo una seroprevalencia del 8% (CI 95% = 3,52 - 15,16) de la enfermedad en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. El promedio general de OD₄₀₅ para los sueros evaluados fue de 0,2127. El valor mínimo de OD₄₀₅ registrado fue de una muestra de la parroquia de Río Verde (0,0763), mientras que el valor máximo de OD₄₀₅ de 0,4842, fue un suero de la parroquia de Santo domingo de los Tsáchilas.

Figura 4. Seroprevalencia de tripanosomosis determinada por ELISAI para un n= 100 de sueros bovinos de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. La línea horizontal entrecortada indica el valor de punto de corte con OD₄₀₅ de 0,3805.



La tabla 3, indica los resultados obtenidos para la evaluación del ensayo de serodiagnóstico, la seroprevalencia y el índice de confianza al 95% (CI), con relación a los distintos posibles factores de riesgo. Entre las diversas parroquias en estudio, se evidenció una mayor cantidad de casos positivos en Valle Hermoso, con 18,75% (3/16), seguido de las siguientes parroquias que presentaron solamente una muestra bovina positiva: Chiguilpe 33,33% (1/3), San Jacinto del Búa

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

14,29% (1/7), El Esfuerzo 9,09% (1/11), Alluriquín 6,67% (1/15) y Santo Domingo de los Colorados 3,85% (1/26). Las muestras procedentes de Puerto Limón, Río Verde y Luz de América no presentaron bovinos seropositivos. Con relación a la variable sexo, la prevalencia de machos fue de 40% (2/5) y hembras de 6,90% (6/87). Las razas bovinas que presentaron anticuerpos IgG anti *Trypanosoma spp.* fueron Criolla 8,33% (2/24), Holstein 8,33% (1/12), Brahman 20% (1/5) y 14,29% (4/28) para razas no identificadas. En cuanto a la edad, los bovinos vacunos tuvieron una mayor prevalencia de la infección por *Trypanosoma spp.* 16,67% (1/6), aunque en el caso de los adultos, con un mayor n, se presentó una seroprevalencia del 8,54% (7/82).

Tabla 3. Distribución de variables utilizadas para investigar los factores de riesgo asociados *Trypanosoma spp.* y la seroprevalencia en bovinos en ELISAI en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas.

Variable	n	Positivos	Negativos	%(95 %CI)
Parroquia				
Chiguilpe	3	1	2	33,33% (0,84 - 90,57)
Alluriquín	15	1	14	6,67% (0,17 - 31,95)
El esfuerzo	11	1	10	9,09% (0,23 - 41,28)
Luz de América	8	-	8	0% (0,00 - 36,94)
Puerto Limón	8	-	8	0% (0,00 - 36,94)
Río Verde	6	-	6	0% (0,00 - 45,93)
San Jacinto del Búa	7	1	6	14,29% (0,36 - 57,87)
Valle Hermoso	16	3	13	18,75% (4,05 - 45,65)
Santo Domingo de los Colorados	26	1	25	3,85% (0,10 - 19,64)

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

Sexo

Macho	5	2	3	40% (5,27 - 85,34)
Hembra	87	6	81	6,90% (2,57 - 14,41)
Indefinido	8	-	8	0% (0,00 - 36,94)

Raza

Mestizo	23	-	23	0% (0,00 – 14,82)
Criolla	24	2	22	8,33% (1,03 - 27,00)
Jersey	2	-	2	0% (0,00 - 84,19)
Holstein	12	1	11	8,33% (0,21 – 38,48)
Brahman	5	1	4	20% (0,51 - 71,64)
Holstein/ Brown Swiss	3	-	3	0%(0,00 - 70,76)
Gyrolando	2	-	2	0% (0,00 - 84,19)
Normando	1	-	1	0% (0,00 - 97,50)
Indefinido	28	4	24	14,29% (4,03- 32,67)

Grupo Etario

Media (7- 12 meses)	6	-	6	0% (0,00 - 45,93)
Vacona (13- 24 meses)	6	1	5	16,67% (0,42 - 64,12)
Adulto (24 >)	82	7	75	8,54% (3,50 - 16,80)
Indefinido	6	-	6	0% (0,00 - 45,93)

4. DISCUSIÓN

En este trabajo se llevó a cabo la implementación de ELISAI para el establecimiento de la seroprevalencia preliminar de tripanosomosis bovina, en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas. En la actualidad, no existen protocolos preestablecidos para la vigilancia de la tripanosomosis, esto se debe a la variedad en la sensibilidad y especificidad de las técnicas reportadas y por la reactividad cruzada que existe entre las especies del género *Trypanosoma* en las técnicas serológicas empleadas para el tamizaje (Cervantes et al., 2014).

En el presente estudio se determinaron las condiciones óptimas para el ensayo inmunoenzimático, con diluciones de suero bovino (1/400), diluciones de conjugado anti-IgG-bovino (1/10000) y tiempo de revelado de 15 min, las cuales generaron la mayor diferencia entre OD₄₀₅ de los diferentes sueros de referencia. En estudio previos, la técnica se ha implementado para el tamizaje de la tripanosomosis, basada protocolos con diversas condiciones, como la descrita por Uzcanga y col., (2002), en la cual se emplea suero diluido desde 1/100, así como una dilución 1/2000 del conjugado y una lectura de revelado a los 30 minutos (Uzcanga et al., 2002). Estas diferencias podrían estar asociadas a los procedimientos implementados en cada laboratorio, así como reactivos y equipos empleados e incluso a las características del antígeno utilizado.

En esta investigación, la seroprevalencia de la tripanosomosis bovina en las 9 parroquias de Santo Domingo de los Tsáchilas fue del 8%. Este resultado indica la posible presencia del parásito circulando en los rebaños evaluados y que la zona ha estado expuesta a este microorganismo infeccioso, siendo un factor de riesgo para todos los animales de la zona. Cabe recalcar que de las muestras positivas detectadas por el método del ELISAI, tres de ellas pertenecen a la parroquia de Valle Hermoso. En nuestro país el número de investigaciones realizadas son limitadas. El primer estudio serológico llevado a cabo, empleando la técnica de

inmunofluorescencia indirecta, reportó una seroprevalencia del 22,5% (Wells et al., 1977). Otros estudios más recientes empleando ELISAI, en otras zonas del Ecuador como la provincia de Pastaza, han registrado seroprevalencias del 31,03% (Medina-Naranjo et al., 2017). Se observa que la seroprevalencia obtenida en el presente estudio, es relativamente baja en comparación a los estudios mencionados. La variación de las cifras comparadas a nivel nacional puede ser consecuencia de ciertos factores, como, por ejemplo, la región en la cual se llevó a cabo el muestreo, la metodología usada para el diagnóstico con ciertas modificaciones, distribución o época del muestreo, la selección del tamaño de la muestra el método empleado para la selección de las localidades muestreadas, entre otras variables. Otros estudios reportan la presencia de *T. vivax* con una prevalencia del 15%, empleando métodos de detección directos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), implementados a muestras bovinas de la provincia de Manabí de la región costera del Ecuador (Chávez-Larrea et al., 2020). De igual manera, utilizando la misma técnica molecular, se ha descrito una prevalencia para *T. vivax* del 30,26% a partir de muestras de Santo Domingo de los Tsáchilas y Esmeraldas (Ron-Román & Reyna-Bello, 2014). Estos resultados, empleado técnicas de directas de detección, son confirmados por los hallazgos de la presente investigación y muestran la necesidad de llevar a cabo mas estudios en la región costa de Ecuador.

En comparación con países de América Latina, en Venezuela se ha descrito una seroprevalencia del 37,7% mediante la técnica de ELISAI para la infección por tripanosomosis bovina (Uzcanga et al., 2016), de igual manera, en Laguneta de la Montaña (Venezuela), se determinaron anticuerpos anti *Trypanosoma spp.* con una seroprevalencia a partir de muestras de sueros con un resultado de 46,5% de seropositividad (Ramírez-Iglesias et al., 2014). En Brasil, mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) se detectó el 49,6% de seroprevalencia (Barbieri et al., 2016).

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

Entre las especies mencionadas, *Haematobia irritans*, presenta predilección por bovinos machos de pelaje oscuro, debido a su mayor temperatura corporal en comparación a bovinos que presenten otras características. En un estudio se comprobó que se debe probablemente a los efectos de la testosterona, también los machos tienen una mayor carga parasitaria, ya que al tener problemas físico-mecánicos al espantar las moscas debido a su fisiología: cuello grueso y hombros que restringen los movimientos articulares (Mancebo et al., 2000). Es probable que, en Santo Domingo de los Tsáchilas, debido a lo anteriormente mencionado, presente mayor seroprevalencia en machos con el 40% (2/5) en comparación con las hembras que obtuvieron una seroprevalencia del 6,90% (6/87).

Según (Mancebo et al., 2000), con relación al grupo etario, se observa una menor prevalencia en especies de edad corta como terneros menores de 8-10 meses, siendo una categoría de menor predilección para el ectoparásito, por razones que aún se desconocen (Bautista Garfias et al., 2011). En comparación con animales de mayor tamaño, superiores a diez meses, presentan cargas más altas de parasitemia, siendo más susceptibles a los de menor edad (Bautista Garfias et al., 2011). En caso de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, de igual manera, no se encuentran casos positivos de medias 7-12 meses, caso contrario, existe una mayor prevalencia en vacas con 16,67% (1/6) y adultos con el 8,54% (7/82).

Tanto los bovinos *Bos taurus* de raza europea (Holstein) como los *Bos indicus* de raza india (Brahman) son propensos a infecciones parasitarias. Sin embargo, mediante estudios se ha comprobado que los *B. indicus*, seguido de sus cruas, presentan mayor resistencia al infestarse por enfermedades en relación de bovinos europeos. Es probable que se deba a sus diferencias genéticas, que se refleja por la alta movilidad de la piel debido a la mayor contracción de los músculos cutáneos y por un incremento de la secreción de las glándulas sebáceas (Moraes et al., 1986; Mancebo et al., 2000; Bautista Garfias et al., 2011). En caso de

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, Holstein tuvo una seroprevalencia de 8,33% (1/12), mientras que la raza Brahman con el 20% (1/5).

En caso de los mestizos y criollos, suelen ser razas que presentan trypanotolerancia, es por eso su importancia en mejorar la genética al cruzar especies para tener una mayor resistencia a ectoparásitos, al tener la capacidad de los bovinos en convivir sin verse comprometidos por los efectos adversos de la enfermedad de mantener los valores del hematocrito y controlar la tasa de crecimiento de la consecuente infección (CONtexto ganadero, 2019; Florio, 2011; Iruegas, 2011). En Santo Domingo de los Tsáchilas no hubo seropositivos de la raza mestiza, mientras de la raza criolla fue de 8,33% (2/24).

La provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas al presentar una zona climática lluviosa tropical húmeda, con una temperatura promedio de 22 °C y un volumen de precipitación de 3.000 a 4.000 mm anuales, es propensa a la presencia de los vectores causantes de la enfermedad de tripanosomosis. Los vectores como *Tabanus sp.*, *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans*, según investigaciones, se han reportado en zonas tropicales, subtropicales y en lugares con temperaturas que oscilan entre los 20 y los 30°C con una humedad relativa del 65 al 90% (Bautista Garfias et al., 2011).

Entre las limitaciones que se pueden mencionar del presente estudio se encuentra el reducido n muestral empleado, lo cual aumenta el nivel de incertidumbre de los datos de seroprevalencia reportados, como se puede observar los amplios valores del CI 95% determinados. De igual forma, al ser una prueba de tamizaje indirecta que carece de especificidad, no es posible asociar la positividad de IgG a la presencia de *T. vivax* o *T. evansi* en los animales. Sin embargo, la presente investigación constituye un aporte para ampliar el conocimiento sobre la tripanosomosis en el país y dar a conocer que, al presentar seroprevalencia positiva frente a esta patología, ya se considera una zona de riesgo con la

presencia de *Trypanosoma spp.*

5. CONCLUSIONES

Se realizó la estandarización de la técnica ELISAI, cuyas condiciones fueron las óptimas para realizar la prueba serológica. La seroprevalencia de tripanosomosis bovina en las muestras de las 9 parroquias de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchila fue del 8%, lo cual indica la posible presencia del parásito en las zonas y rebaños evaluados y sugiere un riesgo para las poblaciones animales, tanto domesticas como silvestres.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer un cálculo del tamaño muestral para realizar estudios con un “n” mayor, con la finalidad de reducir el nivel de incertidumbre de los datos reportados. De igual forma, se recomienda estudiar los posibles vectores que puedan ser la causa de la transmisión de tripanosomas. Posterior a los ensayos serológicos efectuados, se deberían realizar otras investigaciones con la técnica PCR, que permitan establecer la o las especies de *Trypanosoma spp.* presentes en la zona en estudio. Con los resultados obtenidos, se debe informar a la población de los sectores muestreados mediante charlas divulgativas, sobre las posibles implicaciones de la enfermedad en los rebaños de producción pecuaria.

7. RECONOCIMIENTOS

Los reactivos y materiales de este trabajo fueron financiados por la DII de la Universidad Internacional SEK, mediante los proyectos P031920 y PE012020. Las muestras de sueros de bovinos fueron facilitadas por el Centro de Investigación en Zoonosis – CIZ de la Universidad

Central del Ecuador, como parte del convenio que sostienen ambas instituciones.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aregawi, W. G., Agga, G. E., Abdi, R. D., & Büscher, P. (2019). Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>
- Barbieri, J., Caicedo, Y., Pascoti, F. R., & Guimaraes, M. (2016). Soroprevalência de trypanosoma vivax, anaplasma marginale e babesia bovis em rebanhos leiteiros. *Ciencia Animal Brasileira*, 17(4), 564–573. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i434091>
- Batista, J. S., Oliveira, A. F., Rodrigues, C. M. F., Damasceno, C. A. R., Oliveira, I. R. S., Alves, H. M., Paiva, E. S., Brito, P. D., Medeiros, J. M. F., Rodrigues, A. C., & Teixeira, M. M. G. (2009). Infection by *Trypanosoma vivax* in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: From acute disease outbreak to chronic cryptic infection. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.005>
- Bautista Garfias, C. R., Rojas Ramírez, E. E., Hernández, E. L., Preciado de la Torre, J. F., López Arellano, M. E., Fernández Ruvalcaba, M., García Ortiz, M. Á., Mendoza de Gives, P., Cruz, R., Rodríguez, S., Amparán, L., Parra Carretero, A. S., Rojas Castro, F. J., Rodríguez, G., Alvarez, L. A., Munguía Xóchihu, J., Amparán, D., Cantó Alarcón, J., García, C., ... Rodríguez Vivas, R. I. (2011). *EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES PARASITARIAS DE ANIMALES DOMÉSTICOS* (H. Quiroz, J. A. Figueroa Castillo, F. Ibarra Velarde, & M. E. López Arellano (Eds.)).
- Cadioli, F. A., Fidelis Junior, O. L., Sampaio, P. H., dos Santos, G. N., André, M. R., de Almeida Castilho, K. J. G., & Machado, R. Z. (2015). Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. *Veterinary Parasitology*, 214(1–2), 174–177. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.001>
- Cañavate, C., Cuadros, J., Ruiz, R. M., & Martín-Rabadán, P. (2009). *El laboratorio de microbiología ante las*

enfermedades parasitarias importadas (E. Cercenado & R. Cantón (Eds.)).

- Cervantes-Landín, A. Y., Martínez-Martínez, I., Reyes, P. A., Shabib, M., & Espinoza-Gutiérrez, B. (2014). Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(6), 363–368. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.05.006>
- Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R., Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2020). First report and molecular identification of *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* outbreak in cattle population from Ecuador . *Transboundary and Emerging Diseases*. <https://doi.org/10.1111/tbed.13906>
- CONtexto ganadero. (2019, August 14). *Estas son las características de la genética de ganado criollo* | CONtexto ganadero | Noticias principales sobre ganadería y agricultura en Colombia. <https://www.contextoganadero.com/ganaderia-sostenible/estas-son-las-caracteristicas-de-la-genetica-de-ganado-criollo>
- Dávila, E., Huiza, A., Náquira, C., Alva, P., Espinoza, J., Chocano, S. J., Espinoza, Y., Huapaya, P., Suárez, R., Chávez, V., & Sevilla, C. (2003). *Estandarización de la técnica de ELISA para el diagnóstico de Toxocariasis humana* (Vol. 64).
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America*. <http://www.oie.int>
- Desquesnes, M., & Dia, M. L. (2004). Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Veterinary Parasitology*, 119(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.015>
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R., & Jittaplapon, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International*, 676489(10), 1–2. <https://doi.org/10.1155/2013>

ESPAC. (2016). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2016 Contenido*.

Florio, L. (2011). TRYPANOTOLERANCE IN BOVINE LIVESTOCK AT BOLIVARIAN REPUBLIC OF VENEZUELA: EMPHASIS CREOLE CATTLE. In *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA* (Vol. 1).

García, H. A., Ramírez, O. J., Rodrigues, C. M. F., Sánchez, R. G., Bethencourt, A. M., Del M. Pérez, G., Minervino, A. H. H., Rodrigues, A. C., & Teixeira, M. M. G. (2016). *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan Llanos: An unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. *Veterinary Parasitology*, 230, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.013>

García, H., García, M. E., Perez, H., & Mendoza-Leon, A. (2005). The detection and PCR-based characterization of the parasites causing trypanosomiasis in water-buffalo herds in Venezuela. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 99(4), 359–370. <https://doi.org/10.1179/136485905X36271>

Gonzales, J. L., Chacon, E., Miranda, M., Loza, A., & Siles, L. M. (2007). Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. *Veterinary Parasitology*, 146(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.010>

Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma (duttonella) vivax* and typanosomosis in latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261–285). Springer-Verlag Wien. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11

Gutierrez, C., Corbera, J. A., Mmorales, M., & Büscher, P. (2006). Trypanosomosis in Goats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081(1), 300–310. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.040>

Iruegas, L. (2011, November 28). *Los bovinos criollos*. <https://www.ganaderia.com/destacado/Los-bovinos-criollos>

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

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

- Magez, S., & Radwanska, M. (2014). Trypanosomes and Trypanosomiasis. In *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5>
- Mancebo, O. A., Monzón, C. M., & Bulman, G. M. (2000). HAEMATOBIA IRRITANS: UNA ACTUALIZACIÓN A DIEZ AÑOS DE SU INTRODUCCIÓN EN ARGENTINA. In *Veterinaria Argentina* (Vol. 18, Issue 3). www.produccion-animal.com.ar
- Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M., Ron-Román, J. W., Moyano, J. C., Jarrín-Porras, E. C., Sandoval-Morejón, E. D., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). Diagnosis of hemotropics *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. by elisa and PCR techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 27(3), 162–171.
- Mekata, H., Konnai, S., Mingala, C. N., Abes, N. S., Gutierrez, C. A., Dargantes, A. P., Witola, W. H., Inoue, N., Onuma, M., Murata, S., & Ohashi, K. (2013). Isolation, cloning, and pathologic analysis of *Trypanosoma evansi* field isolates. *Parasitology Research*, 112(4), 1513–1521. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3297-3>
- Monzón, C. M., Mancebo, O. A., & Russo, A. M. (2010). Evaluación de las pruebas ELISA-s para la detección de antígenos y anticuerpos en el diagnóstico de Surra (Mal de Caderas) de los equinos. *Veterinaria Argentina*. <http://www.veterinariargentina.com>
- Oliveira, J. B., Hernández-Gamboa, J., Jiménez-Alfaro, C., Zeledón, R., Blandón, M., & Urbina, A. (2009). First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. *Veterinary Parasitology*, 163(1–2), 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.051>
- Organizacion Mundial de la Salud. (2010). OMS | Enfermedades tropicales desatendidas: preguntas más frecuentes. WHO. http://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq/es/
- Osorio, L., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Rios, R., & Celso, D. C. (2008). *Trypanosoma (Duttonella) vivax* : its biology , epidemiology , pathogenesis , and introduction in the New World - A Review. 103(February), 1–13.

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

- Parra, G., & Reyna, A. (2019). *Parasitological, Hematological, and Immunological Response of Experimentally Infected Sheep with Venezuelan Isolates of Trypanosoma evansi, Trypanosoma equiperdum, and Trypanosoma vivax*. <https://doi.org/10.1155/2019/8528430>
- Quiroz Romero, H. (2012). *PARASITOLOGÍA Y ENFERMEDADES PARASITARIAS DE ANIMALES DOMÉSTICOS* – Quiroz Romero, Héctor – 9789681816742 – Librería LIMUSA (5 ed). LIMUSA.
- Quispe, P., Chávez, A., Casas, E., Trigueros, A., & Suárez, F. (2003). PREVALENCIA DE *Trypanosoma vivax* EN BOVINOS DE LA PROVINCIA DE CORONEL PORTILLO, UCAYALI. In *Rev Inv Vet Perú* (Vol. 14, Issue 2).
- Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Gómez-Piñeres, E., & Mendoza, M. (2011). *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Experimental Parasitology*, 128(1), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.010>
- Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Reyna-Bello, A., & Mendoza, M. (2017). Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(2), 450–458. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0826-x>
- Ramírez, J., Ibarra, V., Chacón, Y., Eleizalde, M., Tavares, L., Reyna, A., López, Y., & Mendoza, M. (2014). EVALUACIÓN DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR *Trypanosoma vivax* EN BOVINOS DE LAGUNETA DE LA MONTAÑA, ESTADO MIRANDA. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2(9), 1689–1699.
- Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2014). *Primer reporte e identificación molecular de Trypanosoma vivax en bovinos del Ecuador* *Circulating Strains of Brucella abortus in Cattle in Santo Domingo De Los Tsáchilas Province-Ecuador* *View project* *Taeniasis and cysticercosis complex* *View project*. <https://www.researchgate.net/publication/273808428>
- Sánchez, A. M., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2019). *Tabla 1. NÚMERO DE CABEZAS DE GANADO Años Vacuno Porcino Ovino Asnal Caballar Mular Caprino*.

“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN LA PROVINCIA DE SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”

Sánchez, E., Perrone, T., Recchimuzzi, G., Cardozo, I., Biteau, N., Aso, P., Mijares, A., Baltz, T., Berthier, D., Balzano-Nogueira, L., & Gonzatti, M. (2015). Molecular characterization and classification of *Trypanosoma* spp. Venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplast maxicircle genes. *Parasites and Vectors*, 8(1), 536. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1129-2>

Software GraphPad. (n.d.). Retrieved May 5, 2021, from <https://www.graphpad.com/quickcalcs/>./

Taylor, K. (2004). Pathogenesis of animal Trypanosomiasis. In I. Maudlin, P. . Holmes, & M. Miles (Eds.), *The Trypanosomiasis* (1st ed., pp. 331–353). CABI.
[https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=6Z1zUWY9LroC&oi=fnd&pg=PA331&dq=Taylor+K,+Authie'+EM-L+\(2004\)+Pathogenesis+of+animal+Trypanosomiasis.+In:+Maudlin+I,+Holmes+P,+Miles+M+\(eds\)+The+Tripanosomiasis,+1st+edn.+CABI+Publishing,+Boston,+MA,+pp+331–353&o](https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=6Z1zUWY9LroC&oi=fnd&pg=PA331&dq=Taylor+K,+Authie'+EM-L+(2004)+Pathogenesis+of+animal+Trypanosomiasis.+In:+Maudlin+I,+Holmes+P,+Miles+M+(eds)+The+Tripanosomiasis,+1st+edn.+CABI+Publishing,+Boston,+MA,+pp+331–353&o)

Uzcanga, G. L., Pérez-Rojas, Y., Camargo, R., Izquier, A., Noda, J. A., Chacín, R., Parra, N., Ron, L., Rodríguez-Hidalgo, 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, 31–42.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.007>

Uzcanga, G., Mendoza, M., Aso, P. M., & Bubis, J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*, 124(3), 287–299.
<https://doi.org/10.1017/S0031182001001214>

Wells, E. A., Betancourt, A., & Ramírez, L. E. (1977). *Serological evidence for the geographical distribution of Trypanosoma vivax in the New World. [Correspondence, bovines, South America, Central America]*.
<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XE7805303>