



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA
CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE
ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)”**

Realizado por:

DANILO ALEXANDER HINOJOSA CASTILLO

Director del proyecto:

PhD. José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 28 de mayo del 2021

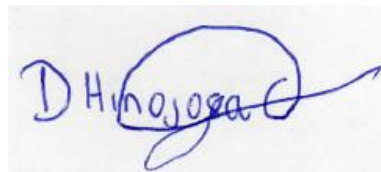
DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

DECLARATORIA JURAMENTADA

Yo, DANILO ALEXANDER HINOJOSA CASTILLO, con cédula de identidad # 1722855614, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a 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.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D Hinojosa C', with a large, stylized flourish extending from the end.

FIRMA

1722855614

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS
BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE
ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)”**

Realizado por:

DANILO ALEXANDER HINOJOSA CASTILLO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

FIRMA

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

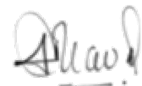
JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO

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, 28 de mayo del 2021

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

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 región oriente de Ecuador.

Perteneciente a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

DEDICATORIA

A mis padres y familiares, quienes me han brindado su apoyo
para cumplir este objetivo.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

AGRADECIMIENTO

A mis padres y hermana, por apoyarme y ayudarme a cumplir mis metas.

A mis demás familiares, por su colaboración en este proceso.

A mis profesores, por enseñarme.

A todas aquellas personas que fueron parte de este camino y colaboraron para este logro.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

Para someter a:

To be submitted:

Danilo Alexander Hinojosa Castillo¹, Juan Carlos Navarro¹,

José Rubén Ramírez Iglesias^{1*}

**“DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS
BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL
ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)”**

¹ Universidad Internacional SEK, Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

28/05/2021

*AUTOR DE CORRESPONDENCIA: PhD. José Rubén Ramírez Iglesias,

Universidad Internacional SEK,

Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas

Quito, Ecuador.

Teléfono: +593 986391273; Email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

RESUMEN

La tripanosomosis es una enfermedad hemoparasitaria producida por protozoarios que pertenecen al género *Trypanosoma*, como *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*, los cuales tienen la capacidad de infectar a varias especies de animales tanto silvestres como domésticos, en distintas regiones tropicales y subtropicales del planeta. Esta enfermedad genera un impacto negativo, a nivel económico y sanitario, en el desarrollo de las unidades de producción pecuaria. A pesar de que Ecuador se ubica en una región donde la tripanosomosis presenta carácter endémico y amplia distribución, cuenta con información epidemiológica limitada sobre la situación de esta patología en su territorio nacional. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de la tripanosomosis causada por *Trypanosoma spp.* en rebaños bovinos pertenecientes a las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos, a través del ELISAI. Para ello, se llevó a cabo la estandarización del ELISAI empleando sueros de referencia negativos y positivos. Posteriormente, se evaluaron 107 muestras de suero de bovinos provenientes de las provincias anteriormente mencionadas y localizadas en la región Oriente del Ecuador. Las condiciones 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. La seroprevalencia general de tripanosomosis bovina en el Oriente ecuatoriano fue de 16.82% (18/107), mientras que a nivel de provincias fue de 6.82% (3/44) en Napo, 22.22% (4/18) en Orellana y de 24.44% (11/45) en Sucumbíos. Estos resultados sugieren la presencia de tripanosomas de interés veterinario en los rebaños bovinos de la zona, e indican un riesgo potencial para todos los animales presentes en las pequeñas unidades de producción localizadas en el oriente del país. Es por ello que se hace necesaria la implementación de estudios serológicos que incrementen el nivel de precisión de los datos de seroprevalencia aquí mostrados

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

y que caractericen de forma específica a las especies de agentes infecciosos en los diferentes hospedadores potenciales y vectores, junto con determinar el nivel de impacto de la enfermedad en la región.

Palabras clave: tripanosomosis, ELISA indirecto, tamizaje serológico, IgG, *Trypanosoma spp.*

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

ABSTRACT

Trypanosomosis is a hemoparasitic disease produced by protozoa belonging to the *Trypanosoma* genus, such as *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma evansi*, which can infect various species of both wild and domestic animals in different tropical and subtropical regions of the planet. This disease has a negative economic and health impact on the development of livestock production units. Although Ecuador is located in a region where trypanosomosis is endemic and widely distributed, it has limited epidemiological information on the situation of this pathology in its national territory. Therefore, this work aimed to determine the seroprevalence of trypanosomosis caused by *Trypanosoma spp.* in cattle herds belonging to the provinces of Napo, Orellana, and Sucumbíos, through the ELISAI. The ELISAI standardization was carried out using negative and positive reference sera. Subsequently, 107 bovine serum samples from the aforementioned provinces and located in the eastern region of Ecuador were evaluated. The 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 anti-bovine IgG conjugate, and 15 minutes incubation / shaking to read the development. The general seroprevalence of bovine trypanosomosis in eastern Ecuador was 16.82% (18/107), while at the provincial level it was 6.82% (3/44) in Napo, 22.22% (4/18) in Orellana and 24.44% (11/45) in Sucumbíos. These results suggest the presence of trypanosomes of veterinary interest in the bovine herds and indicate a potential risk for all the animals present in the small production units located in the eastern part of the country. Hence, it is necessary to implement serological studies that increase the level of precision of the seroprevalence data shown here and that specifically characterize the species of infectious agents in the different potential hosts and vectors, together with determining the level of impact of the disease in the region.

Keywords: trypanosomosis, indirect ELISA, serological screening, IgG, *Trypanosoma spp.*

1. INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis bovina es una enfermedad hemoparasitaria que presenta elevada prevalencia y distribución en las regiones tropicales y subtropicales del norte de África, el sudeste de Asia, América Central y del Sur, y es producida por protozoarios parásitos que forman parte del género *Trypanosoma*, los cuales pueden infectar a varias especies animales tanto de vida salvaje como domésticas (Aregawi *et al.*, 2019; Fetene *et al.*, 2021; Magri *et al.*, 2021). La transmisión mecánica de los agentes causales se lleva a cabo a través de los géneros de insectos hematófagos *Tabanidae* y *Stomoxidae*, que son sus principales vectores, los cuales encuentran condiciones climáticas y ambientales favorables en las zonas tropicales (Desquesnes *et al.*, 2013a; OIE, 2021).

Las especies de tripanosomátidos que producen la tripanosomosis en Latinoamérica son: *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma equiperdum*, que afectan principalmente a caballos, y *Trypanosoma vivax*, que afecta a bovinos. Mundialmente se han asignado distintas denominaciones a esta enfermedad dependiendo de la localización geográfica y el agente causal de la patología. Con respecto a *T. evansi*, la enfermedad en Brasil, Argentina y Paraguay se conoce como Mal de Caderas, en Venezuela se denomina Derrengadera, mientras que la tripanosomosis provocada por *T. equiperdum* es llamada Durina y la provocada por *T. vivax* se denomina Huequera (Desquesnes, 2004; Desquesnes *et al.*, 2013b). Los animales que se encuentran infectados muestran distintos signos clínicos dependiendo del agente causal de la enfermedad. Los signos clínicos que generalmente se desarrollan durante la tripanosomosis bovina son fiebre, anemia, pérdidas de apetito, peso y condición física en general, abortos, infertilidad e incluso esterilidad (Osorio *et al.*, 2008; Gonzatti *et al.*, 2013; Hurtado *et al.*, 2016). Las tripanosomosis presentan un período de prepatencia, en el cual no se manifiestan los signos clínicos característicos de la infección, seguida de una fase aguda que generalmente presenta

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

fiebre, anemia, pérdida de peso, altas parasitemias y una fase crónica en la cual la carga parasitaria disminuye y los signos clínicos pueden desaparecer, pero el parásito continúa en el hospedador (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011-2012; Gonzatti *et al.*, 2013). Adicionalmente, los animales que sobreviven a la patología afrontan otras secuelas como inmunosupresión debido a que el parásito todavía se encuentra presente en el organismo. Esto facilita el avance de otras enfermedades o recaídas, o la disminución de la efectividad de vacunas de otras parasitosis (Desquesnes *et al.*, 2013a). Además, estos individuos mantienen al protozoo tanto en unidades de producción, afectando de forma directa la productividad del animal (Osorio *et al.*, 2008), como en la naturaleza, lo que dificulta aún más el control de la enfermedad (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2016).

Existe una gran variedad de técnicas de detección para el tamizaje y diagnóstico de la tripanosomosis animal, cuya efectividad variará dependiendo de la fase de la enfermedad en la cual se apliquen. Las técnicas parasitológicas se basan en visualizar directamente el parásito en sangre y su aplicación es recomendada en la fase aguda cuando los niveles de parasitemia sean mayores a 10^5 tripanosomas/mL de sangre. Las técnicas serológicas como el ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI por sus siglas en inglés) detectan anticuerpos contra el parásito, pero no logran diferenciar individuos contagiados activos de individuos ya tratados. Las técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son las más sensibles y específicas para detectar y genotipificar al agente infeccioso causante de la enfermedad, siendo aplicables en la fase crónica y en el período de prepatencia de la enfermedad logrando detectar parasitemias de 1 a 10 tripanosomas/mL de sangre u otro fluido (Desquesnes, 2004; Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011; Desquesnes *et al.*, 2013b). La adecuada implementación de estas herramientas de detección y diagnóstico permite conocer la realidad de la enfermedad en una

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

zona determinada y efectuar planes de intervención sanitaria para abordar a las poblaciones afectadas.

El escenario epidemiológico de cualquier enfermedad infectocontagiosa se establece a través de la aplicación de técnicas que permitan identificar al parásito y diagnosticar la patología. Para ello, inicialmente se debe realizar una prueba de tamizaje a una población definida de riesgo para evaluar la probabilidad de que sus miembros posean una enfermedad en particular (Maxim *et al.*, 2014). En lo que respecta a la tripanosomosis, se debe realizar primero un tamizaje epidemiológico, para el cual lo idóneo es realizar pruebas serológicas como el ELISAI. Las principales ventajas de esta técnica radican en el beneficio económico en comparación a otros métodos, y en su sensibilidad para la detección de anticuerpos dirigidos contra agentes infecciosos. Sin embargo, dependiendo de las características del ELISAI aplicado, la prueba puede carecer de especificidad debido a la reactividad cruzada que existe entre las especies de tripanosomátidos *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei spp.*, *T. evansi* y *T. equiperdum* (Desquesnes, 2004; Uzcanga *et al.*, 2016). Esta reactividad cruzada está asociada a las glicoproteínas de superficie variables (VSG), las cuales son dímeros empaquetados y se localizan en la membrana plasmática de los tripanosomátidos. El cambio de la expresión de un gen VSG a otro, tiene como resultado un tripanosoma con un tipo de antígeno variable (VAT) diferente, que permite evadir al sistema inmunitario adaptativo del hospedador, conduciendo a ondas cíclicas de parasitemia (Barry y McCulloch, 2001; Sengupta *et al.*, 2012; Horn, 2014; Cnops *et al.*, 2015; Uzcanga *et al.*, 2016).

La información epidemiológica sobre la situación de esta patología en el Ecuador y más concretamente en el Oriente ecuatoriano es limitada, a pesar de estar en una región con países en los cuales la tripanosomosis presenta carácter endémico y amplia distribución. Entre los pocos estudios sobre tripanosomosis en ganado bovino llevados a cabo en Ecuador, se pueden

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

mencionar el trabajo pionero de seroprevalencia nacional de Wells *et al.* (1977), y, más recientemente, el de Medina-Naranjo *et al.* (2017) realizado en Pastaza, los cuales describen seroprevalencias de 22.5% y 31.03% respectivamente. De igual forma, recientemente se describió por primera vez la presencia de *T. vivax* en la región de la Costa ecuatoriana, empleando herramientas moleculares (Chávez-Larrea *et al.*, 2020). Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de la tripanosomosis causada por *Trypanosoma spp.* en rebaños bovinos pertenecientes a las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos, a través de ELISAi.

2. MÉTODOS

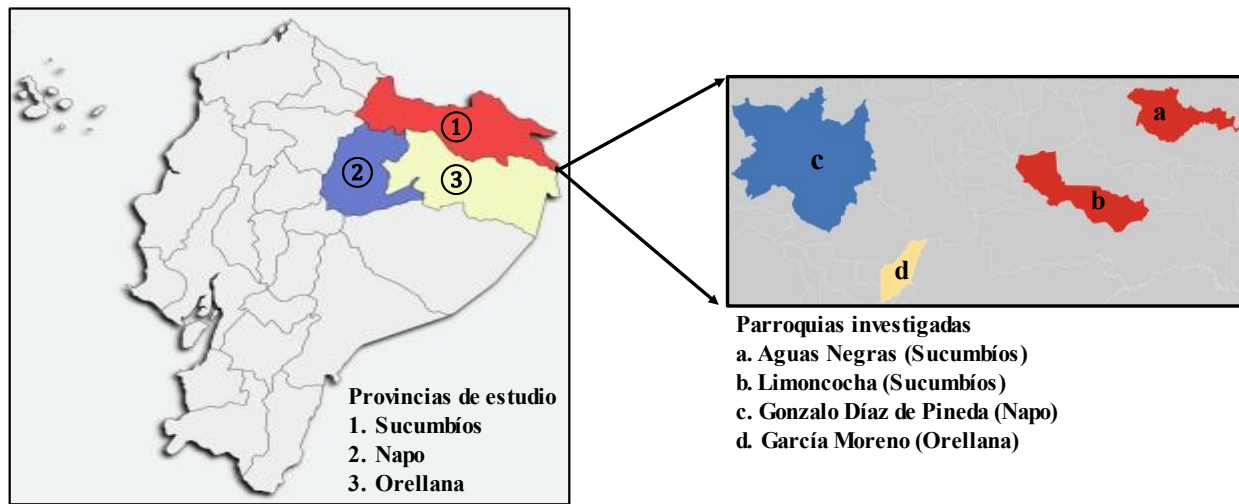
Muestreo

Un total de 107 bovinos de diferentes razas, sexo, grupo etario y parroquias, fueron muestreados entre noviembre de 2014 y noviembre de 2019, en tres provincias del Oriente ecuatoriano. La distribución de los animales muestreados fue la siguiente: 44 de la parroquia Gonzalo Díaz de Pineda en Napo (0°40'12"S, 77°56'24"W), 18 de la parroquia García Moreno en Orellana (0°56'0"S, 75°40'0"W) y 45 en Sucumbíos (0°5'0"S, 76°53'0"W). En esta última provincia el n muestral estuvo constituido por 33 animales de la parroquia Aguas Negras y 12 de la parroquia Limoncocha. Estas 3 regiones están localizadas a una altitud promedio de 1500, 500 y 1200 m.s.n.m., respectivamente (Figura 1). La población aproximada de bovinos presente en estos lugares es de 50419 (Napo), 43517 (Orellana) y 70661 (Sucumbíos) (INEC, 2014).

Aproximadamente 4 mL de sangre por tubo fueron muestreados de la vena coccígea bovina mediante tubos vacutainer, en ausencia de anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), del 10% de la población bovina en tres fincas ganaderas (n = 12) de la parroquia Limoncocha en Sucumbíos. El resto de las muestras evaluadas pertenecen al proyecto "Artrópodos" realizado por el Centro de Investigación en Zoonosis – CIZ de la Universidad Central del Ecuador.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)

Figura 1. Ubicación del área de estudio que incluye las parroquias de Aguas Negras, Limoncocha, Gonzalo Díaz de Pineda y García Moreno.



Preparación del extracto antigénico clarificado

Se empleó el aislado venezolano de *T. equiperdum* TeAp-N/D1, obtenido de un caballo infectado en el Estado de Apure (Venezuela) y caracterizado molecularmente por Sánchez *et al.* (2015). El extracto antigénico clarificado fue preparado siguiendo el protocolo establecido por Uzcanga *et al.* (2002). Los parásitos (10^9), previamente purificados, fueron sonicados en hielo (6 pulsos de 30 segundos cada uno, con descansos intermedios de 30 segundos al 40% de amplitud) usando 600 μ l de 5 mM buffer Tris-HCl (pH 7.2) que contiene 1 mM de benzamidina, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA y 1 mM yodoacetamida. El homogenato resultante se centrifugó a 15000 g por 30 minutos a 4 °C para obtener las fracciones de sobrenadante y pellet. El sobrenadante se usó como fuente de antígenos y se definió como el extracto antigénico clarificado de *T. equiperdum*. La concentración proteica del extracto antigénico clarificado fue determinada por espectrofotometría utilizando el protocolo de Qubit™ descrito por la casa comercial Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Qubit_Protein_Assay_UG.pdf).

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

Estandarización del ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI)

Previo al tamizaje de los sueros, se procedió a la estandarización del ensayo en el laboratorio, con el fin de encontrar las condiciones que permitan obtener una mayor diferencia entre sueros de referencia positivos y negativos. Para establecer las condiciones óptimas del ELISAI, dos diferentes diluciones de suero bovino (1/200, 1/400) y de conjugado anti IgG de bovino (1/10000, 1/20000) fueron probadas. Adicionalmente, el revelado de las placas fue leído a tres tiempos distintos (15 minutos, 30 minutos y 45 minutos). Las muestras empleadas para la estandarización fueron un total de 12 sueros de referencia de bovinos sanos, 3 procedentes de regiones de Venezuela no endémicas a tripanosomosis y 9 sueros procedentes de la región de Imbabura, ubicada a más de 2500 m.s.n.m. Estos animales fueron previamente evaluados por PCR para determinar su negatividad a *T. evansi* y *T. vivax*. Además, se utilizaron 2 sueros de referencia de animales positivos por PCR a *T. vivax*, procedentes de Venezuela.

El protocolo de ELISAI fue realizado según lo descrito por Uzcanga *et al.* (2002) y Ramírez-Iglesias *et al.* (2011), con 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 bovino diluido en buffer PBS-T. Posteriormente, se agregaron 100 µl/pozo de conjugado antibovino 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 diferentes incubaciones se realizaron durante 1 hora en una cámara húmeda a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 100 µl/pozo del cromógeno ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) para el revelado y se agitó la placa a temperatura ambiente (23 °C). Finalmente, se leyó la densidad óptica a 405 nm (D.O._{405nm}) en un

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

espectrofotómetro de microplacas de ELISA (Thermo Fisher Scientific, Multiskan SkyHigh). Se utilizaron seis sueros control negativos en cada ensayo para establecer el punto de corte de cada placa y dos sueros control positivos. Los resultados fueron registrados como la D.O. promedio a 405 nm de los duplicados técnicos de las muestras. Para el tamizaje serológico, el punto de corte se estableció como la media más tres veces la desviación estándar ($X + 3DS$) obtenido a partir de las lecturas de D.O._{405nm} de los sueros de referencia negativos. Se fijó como Coeficiente de Variación (CV) para ensayos y muestras válidas valores de $CV \leq 10\%$ para resultados intra e inter ensayo.

Determinación de la seroprevalencia

El porcentaje de seroprevalencia obtenido mediante la aplicación del ELISAI, se calculó para este estudio a través de la fórmula representada en la Ecuación (1) (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).

$$\text{Seroprevalencia} = \left(\frac{\# \text{ de muestras detectadas como positivas con la técnica}}{\text{Número total de muestras analizadas con la técnica}} \right) * 100 \text{ [\%]} \text{ (Ec. 1)}$$

Análisis estadístico

Se empleó una distribución t de Student para evaluar y comparar las medias de las lecturas de D.O._{405nm} de sueros positivos y negativos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con 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 GraphPad (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/>).

3. RESULTADOS

Estandarización del ELISAI

En la tabla 1 se muestran las diferencias de D.O._{405nm} calculadas entre los sueros de referencia positivos y negativos para cada tiempo de incubación de revelado, mientras que en la

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)

figura 2 se observan las D.O._{405nm} generales, por suero, en los ensayos para la estandarización.

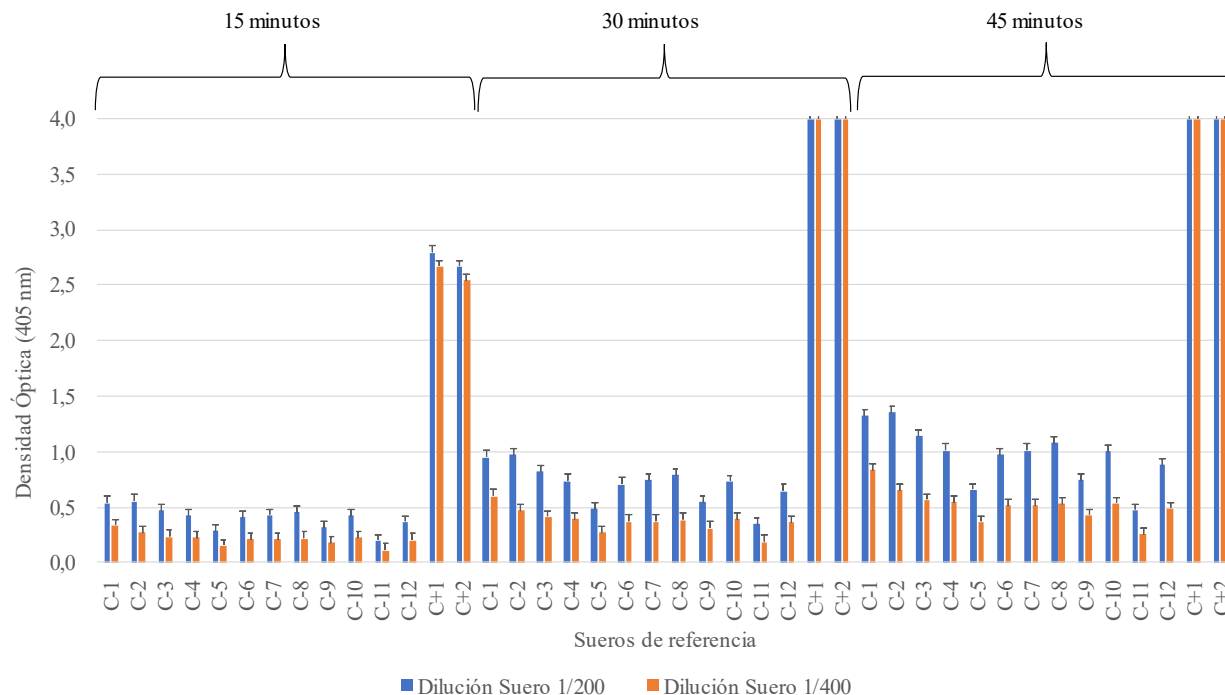
Las diferencias a una dilución de suero 1/200 variaron entre 4.13 a 6.78, en tanto que a 1/400 estuvieron entre 7.75 a 12.28 (Tabla 1). A medida que el tiempo de revelado se incrementaba, las diferencias entre positivos y negativos en las dos diluciones iban disminuyendo. A 30 y 45 minutos los controles positivos alcanzaron el punto de saturación (D.O._{405nm} máxima registrada por el equipo = 4.00) por lo cual se pierde su linealidad y capacidad de registro, representando diferencias inexactas (Figura 2). A un tiempo de incubación de 15 minutos y a una dilución de suero 1/400 se pudo registrar cuantitativamente la mayor diferencia entre los sueros positivos y negativos de referencia, con un valor de 12.28. La dilución de conjugado antibovino 1/20000 generó valores extremadamente bajos para todos los sueros de referencia, por lo que fue descartada (datos no mostrados). Las condiciones óptimas establecidas a través de estas placas de prueba fueron: dilución de suero 1/400, de conjugado anti IgG de bovino 1/10000 y un tiempo de incubación de 15 minutos para la lectura del revelado.

Tabla 1. Diferencias calculadas a partir de los promedios de los sueros de referencia positivos y negativos, a una dilución de conjugado anti IgG de bovino 1/10000.

	Dilución Suero 1/200	Dilución Suero 1/400
Diferencia a 15 min	6.78	12.28
Diferencia a 30 min	5.68	10.67
Diferencia a 45 min	4.13	7.75

Figura 2. Estandarización de la técnica ELISAI. Se muestra la medición registrada para cada suero, junto con su desviación estándar asociada (media \pm DE). Datos obtenidos a una dilución de conjugado anti IgG de bovino 1/10000.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)



Establecimiento del punto de corte

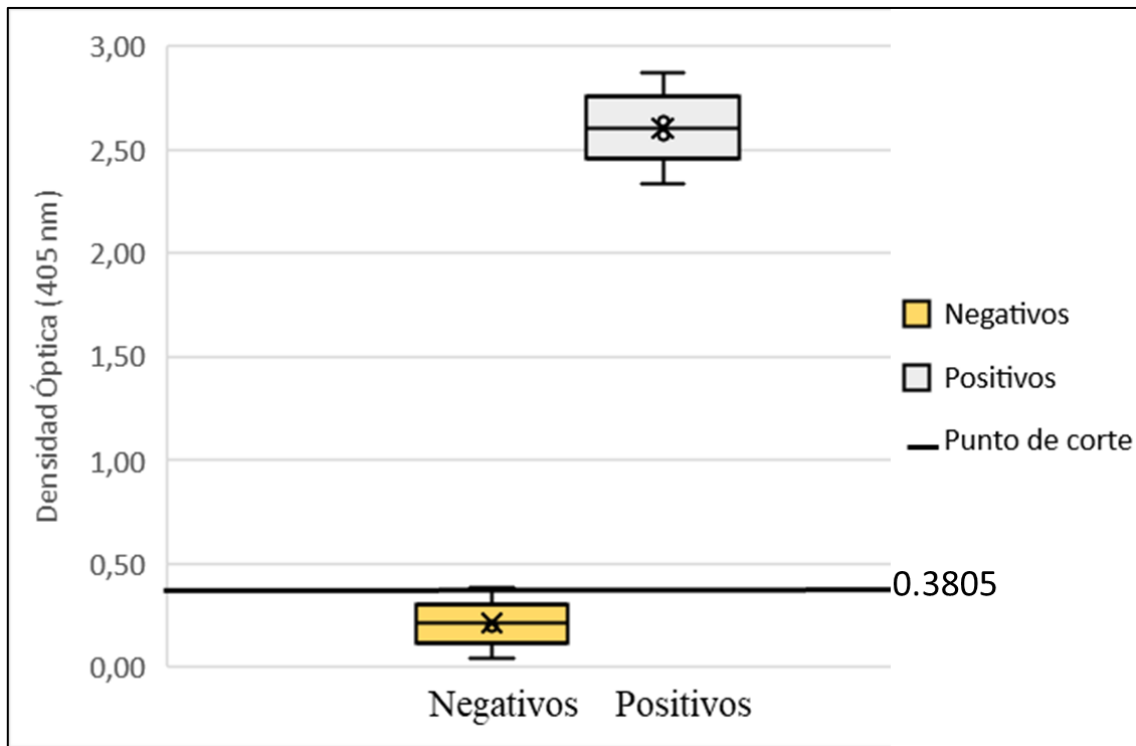
En la figura 3 se encuentra representada la diferencia de D.O._{405nm} existente entre las medias de los sueros de referencia tanto negativos como positivos, bajo las condiciones preestablecidas en el proceso de estandarización. En lo que respecta a los controles negativos, la D.O._{405nm} varió entre 0.1086 a 0.3365, con un promedio de 0.2122 y una desviación estándar de 0.0561, mientras que la D.O._{405nm} de los controles positivos estuvo entre 2.5416 a 2.6686, con un promedio de 2.6051 y una desviación estándar de 0.0898.

Las barras representan el promedio más tres desviaciones estándar de los sueros de referencia positivos (2.6051 + 0.2695) y negativos (0.2122 + 0.1683), resultando en una diferencia de, aproximadamente, 12 unidades entre ambos grupos (Figura 3). Los límites establecidos a partir de la suma de tres veces la desviación estándar de los valores de D.O._{405nm} registrados para los dos grupos, se encuentran lo suficientemente distantes como para discernir correctamente los sueros negativos de los positivos. El punto de corte se determinó por medio de

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)

la medición de la D.O._{405nm} con las condiciones previamente establecidas en las placas de estandarización con 14 sueros de referencia para detectar anticuerpos anti *Trypanosoma spp.*, y se estableció como 0.3805 (0.2122 + 0.1683) (Figura 3). Para establecer las seroprevalencias, se consideró como positivos todos los sueros que presentaron D.O._{405nm} mayores al punto de corte.

Figura 3. Establecimiento del punto de corte a partir de las diferencias de D.O._{405nm} entre los sueros de referencia positivos y negativos.



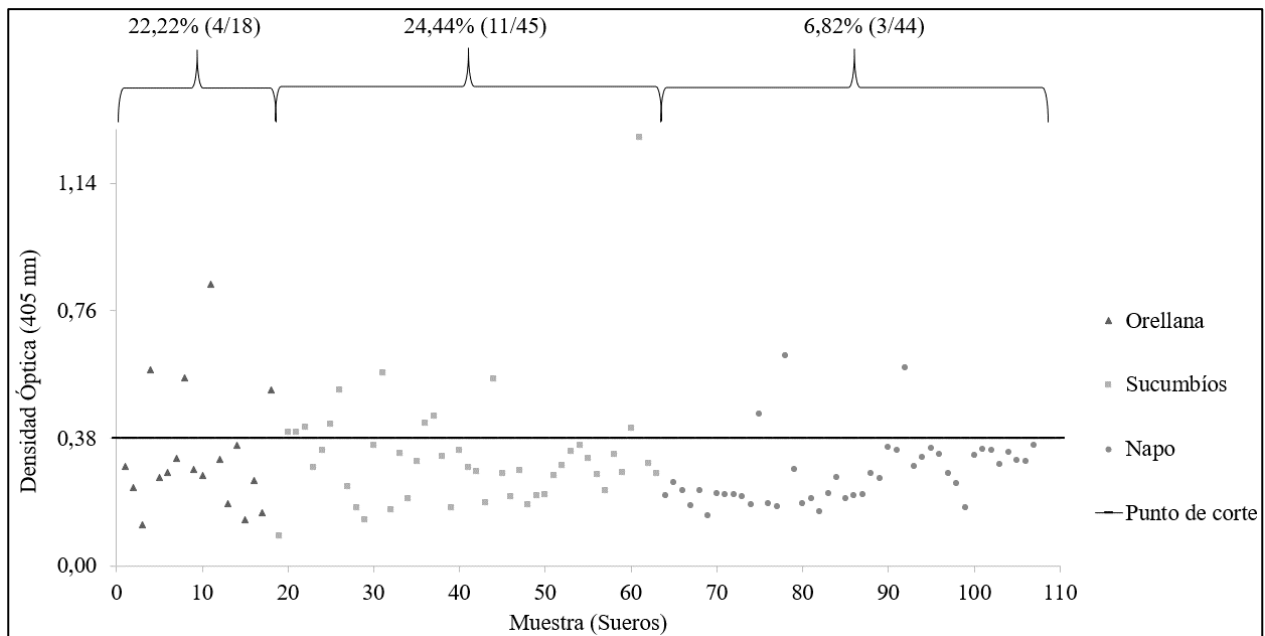
Determinación de la seroprevalencia de tripanosomosis bovina

En la figura 4 se puede observar que de los 107 sueros evaluados se obtuvo un total de 18 muestras positivas por la técnica de ELISAI, correspondiente a una seroprevalencia general de tripanosomosis bovina del 16.82% (95% CI 10.29–25.28) en el Oriente ecuatoriano. A nivel de provincias, se detectaron anticuerpos reaccionantes IgG anti *Trypanosoma spp.* en 6.82% (3/44), 22.22% (4/18) y en 24.44% (11/45) de las muestras evaluadas correspondientes a Napo, Orellana y Sucumbíos respectivamente. Los valores de D.O._{405nm} en la provincia de Orellana fluctuaron

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)

entre 0.1208 a 0.8393 con una media de 0.3322, en la provincia de Sucumbíos entre 0.0900 a 1.2774 con una media de 0.3275 y en la provincia de Napo estuvieron entre 0.1488 a 0.6259 con una media de 0.2748. El valor de D.O._{405nm} más alto de un suero fue de 1.2774, perteneciente a la parroquia de Limoncocha en Sucumbíos, mientras que el más bajo fue de 0.0900, perteneciente a la parroquia de Aguas Negras también en Sucumbíos.

Figura 4. Densidades ópticas de los sueros registrados por ELISAi a partir de las muestras de campo. El punto de corte (0.3805) refleja el valor límite por encima del cual la muestra se cataloga como seropositiva.



La tabla 2 jerarquiza los resultados obtenidos del tamizaje serológico para la tripanosomosis en las poblaciones bovinas estudiadas en el Oriente ecuatoriano. En cuanto al sexo, se obtuvo un porcentaje de detección del 20% ($n = 2/10$) para el sexo masculino y del 16.49% ($n = 16/97$) para el sexo femenino. Por otro lado, los bovinos evaluados pertenecieron a tres razas distintas (Holstein Friesian, Brown Swiss y Mestiza), a partir de lo cual se presenta un mayor porcentaje de positivos en la especie Mestiza con 22.58% ($n = 14/62$). En lo que respecta

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

al grupo etario, se obtuvo un mayor porcentaje de seropositividad en el grupo de Media con un 25% (n = 2/8), asimismo, se cuenta con porcentajes considerables para los grupos de Adulto con un 15.48% (n = 13/84) y un 23.08% (n = 3/13) para los bovinos que no contaron con este dato.

Tabla 2. Resultados del tamizaje serológico mediante ELISAI de tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma spp.* en el Oriente ecuatoriano.

Variable	n	Negativos	Positivos	% (95% CI)
Provincia				
Napo	44	41	3	6.82 (1.43-18.7)
Orellana	18	14	4	22.22 (6.41-47.64)
Sucumbíos	45	34	11	24.44 (12.88-39.54)
Sexo				
Masculino	10	8	2	20.0 (2.52-55.61)
Femenino	97	81	16	16.49 (9.73-25.40)
Raza				
Holstein Friesian	39	35	4	10.26 (2.87-24.22)
Brown Swiss	6	6	0	0 (0.0-45.93)
Mestiza	62	48	14	22.58 (12.93-35)
Grupo etario				
Ternero (0-6 meses)	1	1	0	0 (0.0-97.50)
Media (7-12 meses)	8	6	2	25.0 (3.19-65.09)
Vacona (13-18 meses)	1	1	0	0 (0.0-97.50)
Adulto (>18 meses)	84	71	13	15.48 (8.51-25.01)
Sin dato	13	10	3	23.08 (5.04-53.81)

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se llevó a cabo la estandarización del ELISAI en el laboratorio para, posteriormente, realizar un tamizaje serológico de poblaciones bovinas pertenecientes a las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos, con el fin de detectar anticuerpos IgG anti *Trypanosoma spp.* en los sueros y así establecer datos preliminares sobre la tripanosomosis en el Oriente ecuatoriano.

La detección de tripanosomátidos para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina se puede llevar a cabo a través de la aplicación de diferentes técnicas como el examen directo al microscopio (MDE), la concentración por microhematocrito (CMH) y/o la PCR (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011). Sin embargo, la reactividad cruzada entre especies de tripanosomátidos, la masificación de las muestras a tratar y el rédito económico comparado con las otras técnicas, favorece la aplicación del ELISAI como técnica de tamizaje serológico (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011; Maxim *et al.*, 2014; Uzcanga *et al.*, 2016). Adicionalmente, la estandarización del ELISAI en el laboratorio junto a los distintos controles utilizados por placa, el establecimiento de puntos de corte y la fijación de valores de $CV \leq 10\%$ para la validación de ensayos y de muestras, otorgan confiabilidad a los resultados preliminares que se obtienen en el presente trabajo y reducen las probabilidades de generar la detección de falsos negativos o falsos positivos. El desarrollo de la estandarización de la técnica y el posterior tamizaje serológico realizado constituyen el primer paso para la obtención de datos seroepidemiológicos de la tripanosomosis en la región Oriente del Ecuador.

En el presente trabajo se obtuvo una detección de anticuerpos anti *Trypanosoma spp.* del 22.22% en Orellana, 24.44% en Sucumbíos y 6.82% en Napo, arrojando una seroprevalencia general del 16.82% a partir de los 107 bovinos evaluados serológicamente. Los resultados

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

alcanzados en el presente estudio, aunque menores son comparables con lo expuesto por otros autores, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Estudios relacionados a la tripanosomosis bovina realizados en territorio ecuatoriano.

Estudios	País (Región)	Provincia/ Ciudad	Seroprevalencia (%)	Técnica empleada	n
Presente estudio	Ecuador (Oriente)	Napo	6.82	ELISAi	44
		Orellana	22.22		18
		Sucumbíos	24.44		45
		Oriente	16.82		107
Medina-Naranjo <i>et al.</i> (2017)	Ecuador (Oriente)	Pastaza	31.03	ELISAi	58
González (2016)	Ecuador (Sierra y Costa)	Quito	48	ELISAi	216
		Santo Domingo de los Tsáchilas	75		
Wells <i>et al.</i> (1977)	Ecuador	A nivel nacional	22.5	IFA	310
Ortega-Montalvo <i>et al.</i> (2014)	Ecuador (Sierra)	Quito	30	PCR	152

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)

Medina-Naranjo *et al.* (2017) llevaron a cabo su estudio en la misma región del país, pero en la provincia de Pastaza, evaluando mediante ELISAI a 58 bovinos pertenecientes a 3 fincas y registraron un 31.03% de seropositividad a *Trypanosoma spp.* Esta diferencia de seroprevalencias puede estar relacionada a las prácticas de manejo de animales empleadas en cada finca y a la metodología usada, o a las condiciones utilizadas en laboratorio para la aplicación del ELISAI y a la forma de recolectar las muestras. Adicionalmente, es importante destacar que la provincia de Pastaza cuenta con aproximadamente 15765 cabezas de ganado bovino, lo cual la constituye como la provincia de la Amazonía con la menor cantidad de animales de este tipo de rebaño (INEC, 2014).

Hasta la fecha, este es el primer trabajo sobre la aplicación de una prueba serológica de tamizaje para la detección de anticuerpos IgG anti *Trypanosoma spp.*, en 3 regiones diferentes del Oriente ecuatoriano. En el caso de las regiones de la Sierra y la Costa, se cuenta con más información epidemiológica. En un estudio reciente efectuado por Chávez-Larrea *et al.* (2020), se detectaron molecularmente y se analizaron filogenéticamente amplicones de *Trypanosoma vivax* procedentes de tres fincas ganaderas del cantón Chone en la provincia de Manabí, reportando su asociación con un brote de tripanosomosis bovina en el Ecuador ocurrido durante el año 2017. Por otra parte, los porcentajes de detección obtenidos por González (2016) y Ortega-Montalvo *et al.* (2014), que se observan en la tabla 3, son mayores a los del presente estudio a pesar de que la ciudad de Quito se encuentra a una altitud promedio de 2850 m.s.n.m. Estas diferencias en los porcentajes de detección podrían deberse al tamaño de la población evaluada, las pruebas empleadas y a las condiciones de los ensayos aplicados. Bajo este contexto, es importante resaltar que las ciudades de Quito y Santo Domingo de los Tsáchilas son lugares que cuentan con un mayor índice de flujo comercial de animales, una mayor proporción de actividades ganaderas y un mayor número de bovinos, existiendo alrededor de 254044 y 145006 en las provincias de

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas respectivamente (INEC, 2014). Como dato adicional, según la encuesta de superficie y producción agropecuaria continua, llevada a cabo en el año 2014 por el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), la región Oriental es la que cuenta con una menor población de ganado bovino en el Ecuador continental con 417617 en comparación con los 2351154 de la Sierra y los 1816122 de la Costa.

Es importante mencionar que las provincias evaluadas en este estudio (Napo, Orellana y Sucumbíos) tienen una mayor facilidad y cercanía para el intercambio comercial de animales con localidades de las naciones contiguas de Colombia y Perú. Según Zapata y Reyes (2011), la tripanosomosis bovina es una enfermedad tropical endémica que generalmente se reporta en zonas templadas-húmedas, en altitudes aproximadas de hasta 1000 m.s.n.m., condiciones similares a las del Oriente ecuatoriano.

Al momento de comparar los valores de prevalencia obtenidos en el presente estudio con los de países vecinos de la región, se encontró que Brasil, Colombia, Perú y Venezuela disponen de varios estudios y registros de la prevalencia de la tripanosomosis bovina. Brasil y Venezuela son las naciones con más información en lo que respecta a la situación de *T. vivax* en Sudamérica. Por ejemplo, Suárez *et al.* (2009) determinaron mediante ELISA un 33% de prevalencia a *Trypanosoma spp.* en bovinos muestreados a lo largo de Venezuela. Por otro lado, Ramírez-Iglesias *et al.* (2014) evaluaron la prevalencia de la tripanosomosis en una población de bovinos del Estado Miranda (Venezuela), mediante la detección de *T. vivax* por CMH, ELISAI y PCR, obteniendo un 13.9%, 46.5% y 48.8% respectivamente. En Brasil, Barbieri *et al.* (2016) obtuvieron un 49.6% de prevalencia de IgG contra *T. vivax* empleando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFA) en 400 vacas pertenecientes a un ganado lechero del sur de Minas Gerais, y Madruga *et al.* (2006) reportaron un 56% en el Estado de Mato Grosso do Sul y un 30.7% en el Estado de Pará, utilizando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (Tv-

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

ELISA-Ab). La información variada con la que cuentan otras naciones del continente sobre esta parasitosis fortifica la necesidad de obtener resultados preliminares como los de este artículo para conocer más ampliamente la situación de la tripanosomosis bovina en las distintas zonas geográficas del Ecuador.

El establecimiento de la seroprevalencia en rebaños bovinos del territorio ecuatoriano es un indicativo del riesgo potencial de contraer la enfermedad por parte de los diversos animales de interés pecuario que pueden conformar las pequeñas unidades de producción en zonas rurales. Autores como Fetene *et al.* (2021) han señalado que *T. vivax* está presente en animales domésticos y de fauna silvestre alrededor del mundo, y que los bovinos son la especie más estudiada mundialmente contando con una amplia distribución y seroprevalencia asociada a *T. vivax*. De esta forma, *T. vivax* es un parásito con un amplio rango de hospedadores, de forma similar a *T. evansi* (Desquesnes *et al.*, 2013a; Aregawi *et al.*, 2019; Fetene *et al.*, 2021), por lo que el riesgo de generar brotes es latente en cualquier animal a nivel de fincas o pequeñas unidades de producción. De igual forma, es importante destacar que *T. evansi* puede también afectar a rebaños bovinos (González *et al.*, 2007; Mekata *et al.*, 2009; Ramírez-Iglesias *et al.*, 2016; Jaimes-Dueñez *et al.*, 2019), por lo que se hace necesario emplear técnicas específicas para determinar al agente infeccioso que puede estar circulando en diversas poblaciones bovinas. De igual manera, las condiciones climáticas y ambientales, la biodiversidad y las interacciones entre animales silvestres y domésticos en su entorno significan un mayor riesgo de proliferar y mantener esta parasitosis en el Oriente ecuatoriano. Todo esto permite ratificar la presencia de la tripanosomosis bovina provocada por *Trypanosoma spp.* en el Ecuador, específicamente en las tres provincias donde se llevó a cabo este estudio.

Las limitaciones presentes en este estudio radican principalmente en el número de muestras analizadas por provincias. Es necesario trabajar con una población más grande para que

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

el intervalo de confianza a un CI 95% sea más preciso y de esta forma se logre reducir el nivel de incertidumbre de los resultados preliminares obtenidos en este trabajo. Del mismo modo, es importante recalcar que, al tratarse de una parasitosis poco estudiada en el Ecuador y contar únicamente con un artículo de esta enfermedad en la Amazonía ecuatoriana, se necesitan más investigaciones y registros empleando técnicas moleculares y apoyándose en herramientas de análisis filogenéticos. Los resultados de estos trabajos a largo plazo resultarían en la implementación de planes de control, mitigación e intervención sanitaria oportunos de la patología para salvaguardar tanto el aspecto socio-económico como el tema de salud relacionado.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, se determinó una seroprevalencia general de anticuerpos anti *Trypanosoma spp.* mediante ELISAi del 16.82% (n = 18/107). Este es el primer reporte sobre la prevalencia de la tripanosomosis bovina realizado en las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos en el Oriente ecuatoriano, empleando técnicas serológicas de tamizaje. Esta seroprevalencia podría estar asociada a la presencia del agente infeccioso en la zona, las condiciones ideales para su transmisión y el intercambio comercial de animales existente entre provincias, regiones y países vecinos. La detección de anticuerpos anti *Trypanosoma spp.*, indica un riesgo para todos los animales, tanto domésticos y de fauna silvestre asociados a las unidades de producción de las localidades estudiadas. Las condiciones climáticas y ambientales, la biodiversidad, las actividades pecuarias, el intercambio comercial de animales y las interacciones entre animales silvestres y domésticos representan un mayor riesgo de proliferar y mantener esta parasitosis en la región, lo que debe ser considerado para implementar medidas estrictas de control sanitario y planes tanto de mitigación como de prevención de la tripanosomosis bovina.

6. RECOMENDACIONES

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

Se requiere realizar más estudios relacionados a la tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma spp.* analizando una mayor población de bovinos por provincia, para establecer datos preliminares dentro de un intervalo de confianza más preciso (CI 95%) y así reducir su nivel de incertidumbre con respecto a los indicadores epidemiológicos. Una vez se haya llevado a cabo el tamizaje serológico total, se debería confirmar el diagnóstico a través de técnicas más sensibles y específicas, como la PCR. Además, se deberían realizar estudios sobre la presencia de insectos hematófagos en el Oriente ecuatoriano para definir más concretamente los riesgos asociados a la existencia de la enfermedad en esta región.

7. RECONOCIMIENTOS

Los reactivos y materiales de este trabajo fueron financiados por la Dirección de Investigación e Innovación (DII) proyecto PE012020 de la Universidad Internacional SEK, Ecuador. 95 muestras utilizadas en este estudio son parte de un convenio establecido entre la Universidad Internacional SEK y el Centro de Investigación en Zoonosis – CIZ de la Universidad Central del Ecuador, y pertenecen al proyecto “Artrópodos” llevado a cabo por esta institución.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aregawi Weldegebrail G., Agga Getahun E., Abdi Reta D. and Büscher Philippe. (2019). Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *BMC, Parasites & Vectors*, 12:67.
- Barbieri Jonata de Melo, Caicedo Blanco Yuly Andrea, Pascoti Bruhn Fábio Raphael, Guimarães Antônio Marcos. (2016). Seroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. *Cienc. anim. bras.*, Goiania, v.17, n.4, p. 564-573. Brazil.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

- Barry, J.D. and McCulloch, R. (2001). Antigenic variation in trypanosomes: enhanced phenotypic variation in a eukaryotic parasite. *Adv. Parasitol.*, 49, 2–70.
- Chávez-Larrea María Augusta, Medina-Pozo Michell Lorena, Cholota-Iza Cristina E., Jumbo-Moreira Jimmy R., Saegerman Claude, Proaño-Pérez Freddy, Ron-Román Jorge, Reyna-Bello Armando. (2020). First report and molecular identification of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transbound Emerg Dis.* 2020; 00: 1– 7.
- Cnops, J., Magez, S., De Trez, C. (2015). Escape mechanisms of African trypanosomes: why trypanosomosis is keeping us awake. *Parasitology*, 142, 417–427.
- Desquesnes, Marc. (2004). Livestock Trypanosomoses and their vectors in Latin America. *OIE* (World organization for animal health). Paris, France.
- Desquesnes Marc, Holzmuller Philippe, Lai De-Hua, Dargantes Alan, Lun Zhao-Rong and Jittapalpong Sathaporn. (2013a). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *Hindawi Publishing Corporation*, BioMed Research International. Volume 2013, Article ID 194176, 22 pages.
- Desquesnes Marc, Dargantes Alan, Lai De-Hua, Lun Zhao-Rong, Holzmuller Philippe and Jittapalpong Sathaporn. (2013b). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. *Hindawi Publishing Corporation*, BioMed Research International. Volume 2013, Article ID 321237, 20 pages.
- Fetene Eyerusalem, Leta Samson, Regassa Fikru and Büscher Philippe. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors* (2021) 14:80.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

González J.L., Chacón E., Miranda M., Loza A., Siles L.M. (2007). Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. *Elsevier, Veterinary Parasitology* 146 (2007) 9–16.

González, Z.E. (2016). Optimización de la técnica inmunoenzimática ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra *Trypanosoma spp.* en el ganado bovino. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. *Tesis de Grado*. Ecuador. 95 pp.

Gonzatti M.I., González-Baradat B., Aso P.M. and Reyna-Bello A. (2013). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: Magez S., Radwanska M. (Eds) *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer, Vienna.

Horn, D. (2014). Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 195, 123–129.

Hurtado Betancur, O. J., Castro Jimenez, P. D. and Giraldo-Ríos, C. (2016). Reproductive failures associated with *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*. *Elsevier, Veterinary Parasitology*, 229, 54–59. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.09.017.

INEC. 2014. «Encuesta de Producción Agropecuaria Continua: Variable Existencia de ganado vacuno (tabla 41)». <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-produccion-agropecuaria-continua/>.

Jaimés-Dueñez Jeiczon, Zapata-Zapata Carolina, Triana-Chávez Omar, Mejía-Jaramillo Ana M. (2019). Evaluation of an alternative indirect-ELISA test using in vitro-propagated *Trypanosoma brucei brucei* whole cell lysate as antigen for the detection of anti-*Trypanosoma evansi* IgG in Colombian livestock. *Elsevier, Preventive Veterinary Medicine* 169 (2019) 104712.

Madrugá Claudio R, Araújo Flávio R, Cavalcante-Goes Gustavo, Martins Charles, Pfeifer Ingá B, Ribeiro Laura R, Kessler Raul H, Soares Cleber O, Miguita Midori, Melo Elaine PS,

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma spp.* EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS)

- Almeida Robson FC, Lima Jr. Manoel MSC. (2006). The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(7): 801-807.
- Magri Alice, Galuppi Roberta and Fioravanti Marialetizia. (2021). Autochthonous *Trypanosoma spp.* in European Mammals: A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes. *Pathogens* 2021, 10, 334.
- Maxim L. Daniel, Niebo Ron and Utell Mark J. (2014). Screening tests: a review with examples. *Inhalation Toxicology*, 2014; 26(13): 811–828. Informa Healthcare USA, Inc.
- Medina-Naranjo, Viviana Lisette; Reyna Bello, Armando; Tavares-Marques, Lucinda María; Campos, Ana María; Ron Román, Jorge Washington; Moyano, Juan Carlos; Jarrín Porras, Estefani Carolina; Sandoval Morejón, Elizabeth Dayan; Chávez Larrea, María Augusta. (2017). Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma spp.* y *Babesia spp.* mediante las técnicas de ELISAi y PCR en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica*, vol. XXVII, núm. 3, pp. 162-171. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- Mekata Hirohisa, Konnai Satoru, Witola William H., Inoue Noboru, Onuma Misao, Ohashi Kazuhiko. (2009). Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Elsevier, Infection, Genetics and Evolution* 9 (2009) 1301–1305.
- OIE - Office International des Epizooties. (2021). Trypanosomosis (tsetse-transmitted). Aetiology Epidemiology Diagnosis Prevention and Control References.
- Ortega-Montalvo Henry, Ron-Román Jorge, Reyna-Bello Armando and Chávez-Larrea Ma. (2014). First report and molecular identification of *Trypanosoma vivax* in cattle from Ecuador. Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE. *Tesis de Grado*. Ecuador.

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

Osorio, A.L., Madruga, C.R., Desquesnes, M., Soares, C.O., Ribeiro, L.R., Costa, S.C. (2008).

Trypanosoma (Duttonella) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis and introduction in the New World-a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 103(1): 1-13.

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. *Elsevier*, Experimental Parasitology 128, 91–96.

Ramírez-Iglesias J.R., Eleizalde M.C., Gómez-Piñeres E. and Mendoza M. (2012). *Trypanosoma evansi*: A clinical, parasitological, and immunological evaluation of trypanosomosis using a chronic rabbit model. *Open Veterinary Journal*, Vol. 2: 78-82.

Ramírez-Iglesias José, Ibarra Victoria, Chacón Yaremis, Eleizalde Mariana, Tavares Lucinda, Reyna Armando, López Yanina, Mendoza Marta. (2014). Evaluación de la tripanosomosis causada por *Trypanosoma vivax* en bovinos de laguneta de la montaña, estado Miranda. *Observador del Conocimiento*, Vol 2 N°2. Venezuela.

Ramírez-Iglesias J. R., Eleizalde M. C., Reyna-Bello A., Mendoza M. (2016). Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidence of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *Springer*, J Parasit Dis. DOI 10.1007/s12639-016-0826-x

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

DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR
Trypanosoma spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA,
SUCUMBÍOS)

Sengupta, P.P., Balumahendiran, M., Balamurugan, V., Rudramurthy, G.R., Prabhudas, K.

(2012). Expressed truncated N-terminal variable surface glycoprotein (VSG) of
Trypanosoma evansi in *E. coli* exhibits immuno-reactivity. *Vet. Parasitol.* 187, 1–8.

Suárez Claribel, García Francisco, Román Diego, Coronado Alfredo, Perrone Trina, Reyna
Armando y Parra Nereida. (2009). Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis
bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Trop.*, 27(4): 363-372.

Uzcanga G., Mendoza M., Aso P. M. and Bubis J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from
Trypanosoma evansi that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*
124, 287–299.

Uzcanga Graciela L., Pérez-Rojas Yenis, Camargo Rocío, Izquier Adriana, Noda José A., Chacín
Ronny, Parra Nereida, Ron Lenin, Rodríguez-Hidalgo Richar, Bubis José. (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 (2016) 31–42.

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

Zapata, Richard y Reyes, Julián. (2011). Tripanosomosis bovina en hembra de raza especializada
en producción de leche de zona Alto Andina, Antioquia: presentación de un caso. *Hechos*
Microbiológicos, 2(2); 81-87. Universidad de Antioquia, Colombia.