



**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE  
*Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE  
INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y  
SUCUMBÍOS, ECUADOR”**

Realizado por:

**MARIBEL ALEXANDRA AVILA CARABAJO**

Director del proyecto:

**Dr. José Rubén Ramírez, Ph.D.**

Como requisito para la obtención del título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

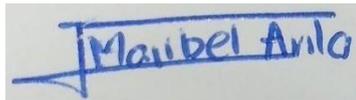
Quito, 11 de Abril de 2022

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

**DECLARACION JURAMENTADA**

Yo, MARIBEL ALEXANDRA AVILA CARABAJO, con cédula de identidad 0302560735, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado de 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.



Maribel Alexandra Avila Carabajo

C.I. 0302560735

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“Detección molecular y análisis filogenéticos de *Trypanosoma vivax* en equinos y caninos naturalmente infectados, en parroquias de la provincia de Pichincha y Sucumbíos, Ecuador”**

Realizado por:

**MARIBEL ALEXANDRA AVILA CARABAJO**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

ha sido dirigido por el profesor

**JOSÉ RUBÉN RAMIREZ**

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

PhD. José Rubén Ramírez

**DIRECTOR**

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

PhD. Juan Carlos Navarro

PhD. Marbel Torres

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



FIRMA



FIRMA

Quito, 11 de Abril de 2022

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

## AGRADECIMIENTO

En primer lugar doy gracias a Dios ser quien me regala tantas las bendiciones.

A la Universidad Internacional SEK por permitirme escalar un peldaño más a nivel académico, a mis maestros que formaron parte de este proceso de formación, especialmente a mi Tutor PhD. Rubén Ramírez, quien con su conocimiento y entrega logra que los estudiantes demos lo mejor.

Agradecer a mis padres, hermanos y sobrinos, quienes han sido mi pilar fundamental en todo momento.

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR**

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

**SALUD GLOBAL**

Y con el financiamiento del proyecto titulado:

**Diagnóstico, diversidad y patrones epidemiológicos de enfermedades desatendidas y reemergentes**

**Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación**

DII-P011617\_2

11/04/2022

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

Para someter a:

To be submitted:

**Detección molecular y análisis filogenéticos de *Trypanosoma vivax* en equinos y caninos naturalmente infectados, en parroquias de la provincia de Pichincha y Sucumbíos, Ecuador**

Maribel Avila<sup>1</sup>, Juan Carlos Navarro 1, José Rubén Ramírez Iglesias<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales,  
Quito, Ecuador.30 /03/2022

\*AUTOR DE CORRESPONDECIA: José Rubén Ramírez, PhD. Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias Naturales y Ambientales, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-0986391273; email: [jose.ramirez@uisek.edu.ec](mailto:jose.ramirez@uisek.edu.ec)

Título corto o Running title:

*Trypanosoma vivax* en Pichincha y Sucumbios-Ecuador

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

## Resumen

*Trypanosoma vivax* es un parásito que pertenece a la familia Trypanosomatidae, y causa tripanosomosis, esta enfermedad tiene una extensa distribución en zonas como: África, Asia y América Latina. Afecta principalmente a bovinos y equinos entre otros. El animal infectado puede cursar la enfermedad con varios signos y síntomas principalmente la pérdida de peso, anemia, descenso en la producción y muerte, siendo el causante de pérdidas económicas. Existen escasos estudios de *T. vivax* en Ecuador, pero ninguno en las provincias de Pichincha y Sucumbíos en la que empleen técnicas moleculares. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue detectar molecularmente y realizar un análisis de relaciones filogenéticas de *Trypanosoma vivax* en equinos y caninos naturalmente infectados, procedentes de parroquias de la provincia de Pichincha y Sucumbíos, Ecuador. Se estudiaron 33 muestras de ADN de equinos y caninos de Pedro Vicente Maldonado y Aguas Negras. 2 (6,06% de prevalencia) dieron positivas para *T. vivax* utilizando una PCR de punto final, amplificando un fragmento de la región ITS-1 y confirmada con el antígeno específico de la especie *T. vivax* (ILO) y de cisteína similar a la catepsina L. La inferencia filogenética se realizó mediante un árbol de Máxima Parsimonia, cuando se utilizó la región ITS1 se observó una similitud con aislados de Sudamérica y África oriental, mientras que con la región similar a CAT-L, la similitud fue con los aislados ecuatorianos del estudio realizado de Manabí en 2017. Este es el primer estudio de la presencia de *T. vivax* en 2 provincias del Ecuador, Pichincha y Sucumbíos, empleando herramientas moleculares.

**Palabras clave:** *Trypanosoma vivax*, caninos, equinos.

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

## Abstract

*Trypanosoma vivax* is a parasite that belongs to the family Trypanosomatidae, and causes trypanosomosis, this disease has a wide distribution in areas such as: Africa, Asia and Latin America. It mainly affects cattle and horses among others. The infected animal can present the disease with several signs and symptoms, mainly weight loss, anemia, decrease in production and death, being the cause of economic losses. There are few studies of *T. vivax* in Ecuador, but none in the provinces of Pichincha and Sucumbíos using molecular techniques. Therefore, the objective of the present work was to detect molecularly and perform an analysis of phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* in naturally infected equines and canines from parishes in the provinces of Pichincha and Sucumbíos, Ecuador. Thirty-three DNA samples from equines and canines from Pedro Vicente Maldonado and Aguas Negras were studied. Two (prevalence of 6,06%) were positive for *T. vivax* using an end-point PCR, amplifying a fragment of the ITS-1 region confirmed with the species-specific antigen *T. vivax* (ILO) and cysteine cathepsin L-like cysteine. Phylogenetic inference was performed using a Maxima Parsimony tree, when using the ITS1 region, similarity was observed with isolates from South America and East Africa, while with the CAT-L-like region, the similarity was with Ecuadorian isolates from the study conducted from Manabí in 2017. This is the first study of the presence of *T. vivax* in 2 provinces of Ecuador, Pichincha and Sucumbíos, employing molecular tools.

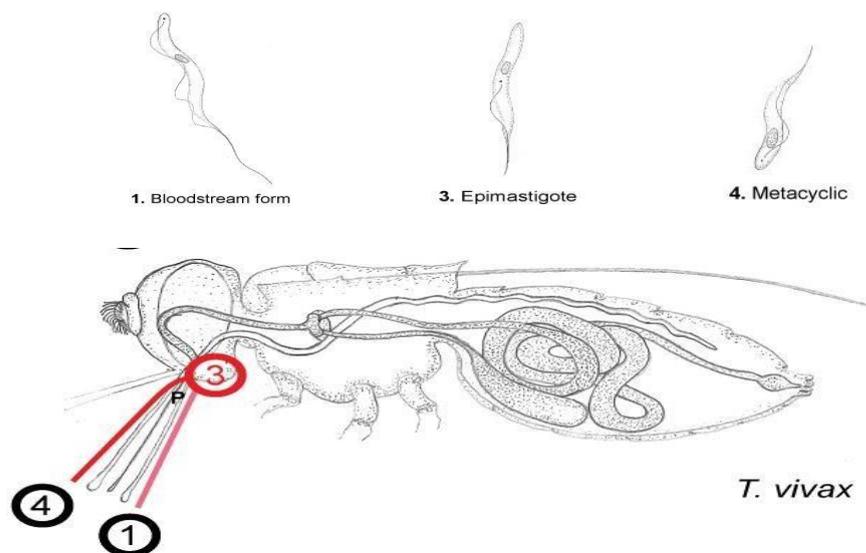
**Key words:** *Trypanosoma vivax*, canines, equines.

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR

## 1. Introducción

La tripanosomosis es una enfermedad hemoparasitaria provocada por varios protozoos de la familia *Trypanosomatidae*, género *Trypanosoma*, (Reis et al., 2019). El género *Trypanosoma* abarca diferentes especies entre ellas *T. brucei*, *T. congolense*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. simiae*, *T. suis* y *T. vivax*. La tripanosomosis tiene una extensa distribución en zonas África, Asia y América Latina (Fetene et al., 2021).

Durante el ciclo de vida del *Trypanosoma vivax* se encuentran formas epimastigotes y metacíclicas, siendo carente de una etapa procíclica en la que se ve implicada el intestino medio del insecto, lo que no permite la migración compleja dentro del insecto; por el contrario, este parásito se desarrolla directamente en formas de epimastigotes dentro de la probóscide del insecto (Figura 1). Esta característica podría justificar, el por qué *este Trypanosoma* puede ser transmitido por otros tipos de insectos picadores (Jackson et al., 2015).



**Figura 1.**  
**Ciclo de vida del *Trypanosoma vivax*.**

La figura señala la anatomía del insecto abreviándose así: probóscide (P). El ciclo biológico dentro de la mosca definida por etapas: (1) Ingestión de parásitos; (2)

## **DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

migración de parásitos al intestino medio del insecto, diferenciándose en formas procíclicas (*T. vivax* no tiene esta etapa); (3) migración anterior a la probóscide y diferenciación en formas epimastigotes; (4) diferenciación en formas metacíclicas e inoculación en el huésped vertebrado al alimentarse los insectos.

En África, la transmisión de la tripanosomosis se da principalmente a por medio del desarrollo cíclico en las moscas tsetse (Diptera: Glossiidae), mientras que en América Latina y otras áreas, la vía de transmisión es la mecánica, a través de la picadura de moscas del género *Tabanidae* y de las especies *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans* (Fetene et al., 2021) (Bastos et al., 2020).

La tripanosomosis puede afectar a diferentes hospedadores, específicamente animales, ya sean salvajes o domésticos y de forma muy poco frecuente, a humanos. En el ganado el agente etiológico con mayor importancia por su patogenicidad es *Trypanosoma vivax*. Este protozoo está reportado en ganado vacuno, dromedario, cabras, ovejas, caballos, burros (Reis et al., 2019) (Fetene et al., 2021).

Se conoce que el ganado infectado por este protozoario puede cursar diversas etapas de la enfermedad entre ellas la fase de prepatencia, fase aguda, crónica o asintomática. Los signos clínicos son la anemia, disminución de peso, descenso en la producción de leche, en ocasiones suele ser fatal si no se trata (Silva Pereira et al., 2020) (Vieira et al., 2017). Existen diferentes métodos de diagnóstico para la detección de la tripanosomosis animal. El más utilizado para la detección del parásito es a través de la observación del parásito al microscopio. Otra técnica directa es la centrifugación del hematocrito la cual concentra los parásitos cerca de la capa de células leucocitarias. Estas técnicas son de bajo costo y fáciles de realizar, pero su sensibilidad analítica se ve limitada, siendo únicamente efectivos para la fase aguda de la enfermedad, en una alta parasitemia (Nakamura et al., 2021) (Eleizalde et al., 2011). Para estudios epidemiológicos el método inmunológico más aplicada es el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas Indirecto o ELISAi para

## **DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

la detección de anticuerpos, no obstante esta técnica no muestra una infección en curso y no permite la diferenciación de infección entre *Trypanosomas* (Nakamura et al., 2021).

En la actualidad, los métodos moleculares se basan en la detección de ADN o ARN del parásito, estas técnicas tienen una alta sensibilidad y especificidad, logrando detectar de 1 a 10 tripanosomas/ml de sangre a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Dávila et al., 2003).

Para la técnica molecular de PCR se ha utilizado una región dirigida al espaciador transcrito interno (ITS) de los genes ribosomales, debido a su elevada sensibilidad dada por el extenso número de copias y la variación de longitud entre especies, (Njiru et al., 2004; Gaithuma et al., 2019) (Takeet et al., 2017) (Njiru et al., 2004; Gaithuma et al., 2019). Otro marcador representativo, incorpora las secuencias de las enzimas tipo catepsina L (CatL), las cuales son cisteínas proteasas esenciales en el metabolismo, infectividad, inmunidad, patogenicidad de los tripanosomas. Esta región ha sido planteada como un marcador genético idóneo para el análisis de la diversidad intraespecíficas de *T. vivax* (Cortez et al., 2009). Finalmente el marcador ILO, debido a que es una secuencia tándem que codifica un antígeno de diagnóstico de *Trypanosoma vivax*. La secuencia de esta región tiene mayor número de copias y al conservada se encuentra reportada en todos los aislamientos de *T. vivax* existentes hasta la fecha (Masake et al., 1997).

Existe escasa información de estudios moleculares y filogenéticos realizados en Latinoamérica. Entre los pocos estudios sobre tripanosomosis llevados a cabo encontramos el realizado en el noreste de Brasil en el año 2017 en ganado lechero (Vieira et al., 2017), y más actualmente el realizado en Venezuela el de (Eleizalde et al., 2021). En América Latina la tripanosomosis bovina se encuentra ocupando el tercer lugar, entre las enfermedades parasitarias de importancia económica. A pesar de su impacto tanto

## **DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR**

económico como en la salud animal, ha sido descuidada en términos de sensibilización, intervención para su control (Osório et al., 2008).

La ganadería es una de las actividades más desarrolladas en la agroindustria en el Ecuador, con un aproximado de 4.1 millones de bovinos distribuidos en las cuatro regiones: 48.4% en la sierra (producción de leche), en la costa 42.4% (ganado para producción de carne y leche) y el oriente ecuatoriano junto con las Islas Galápagos cubre el 9,13%, destinados a la producción de leche o carne. Debido a su localización geográfica, este país brinda un ambiente favorable para crecimiento de vectores. De acuerdo a la actividad económica preeminente y al factor de riesgo predisponente, es imprescindible realizar estudios que ayuden a saber la situación de estos protozoos en el país.

En el territorio nacional existen escasos de estudios realizados sobre tripanosomosis, aplicando herramientas moleculares, entre los pocos que se pueden hacer mención están: el realizado Wells et al. (1977), en el que reportó una seroprevalencia del 22,5%, empleando una técnica serológica (IFI), primer publicación en el país; un estudio relevante, es el realizado en la provincia de Manabí por (Chávez-Larrea et al., 2020) reportando un brote en el cantón de Chone en el 2017, con una prevalencia del 15%, usando una técnica molecular (PCR), otro estudio es el realizado por Burgos (2021) en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, aplicando una técnica serológica (ELISAi) mostrando una seroprevalencia de 8%, y el trabajo publicado por Hinojosa (2021), donde reporta una seroprevalencia de 16.82%, realizado en el Oriente Ecuatoriano, los cuales indican la presencia de este hemoparásito en el Ecuador (tabla 1).

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

**Tabla 1.** Resumen de trabajos de Tripanosomosis realizados en Ecuador, Autores, provincias de estudio, prevalencia reportada, técnica utilizada.

AUTORES	PROVINCIA	PREVALENCIA (%)	TECNICA APLICADA
Wells et al. (1977)	Nivel nacional	22.5	IFI
Chávez-Larrea et al. (2020)	Manabí	15	PCR
Hinojosa (2021)	Napo, Orellana y Sucumbíos	16.82	ELISAI
Burgos (2021)	Santo Domingo de los Tsáchilas	8%	ELISAI

Los rasgos moleculares reportados servirán como base para estudios epidemiológicos posteriores, que permitan comprender los genotipos de los parásitos que se encuentran circulando en la zona de estudio. Resulta crucial lograr una introducción de programas de vigilancia tanto para los parásitos y vectores del *Trypanosoma vivax*. Conseguir que se implemente estrategias de diagnóstico y control en la zona estudiada, permitirá una disminución en la transmisión de este *Trypanosoma* a animales sanos, protegiendo a la industria ganadera del país.

La implementación de pruebas moleculares permitirá la detección de *Trypanosoma vivax* en caninos y equinos de la provincia de Pichincha y Sucumbíos, demostrará si existe una relación filogenética cercana entre las especies de *Trypanosoma vivax* presentes en Pedro Vicente Maldonado y Aguas Negras con *T. vivax* reportados en cantón de Chone por Chavez Larrea en el 2020 y las secuencias de publicadas a nivel mundial. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar molecularmente *Trypanosoma vivax* en caninos y equinos infectados naturalmente procedentes de la provincia de Pichincha y Sucumbíos, Ecuador.

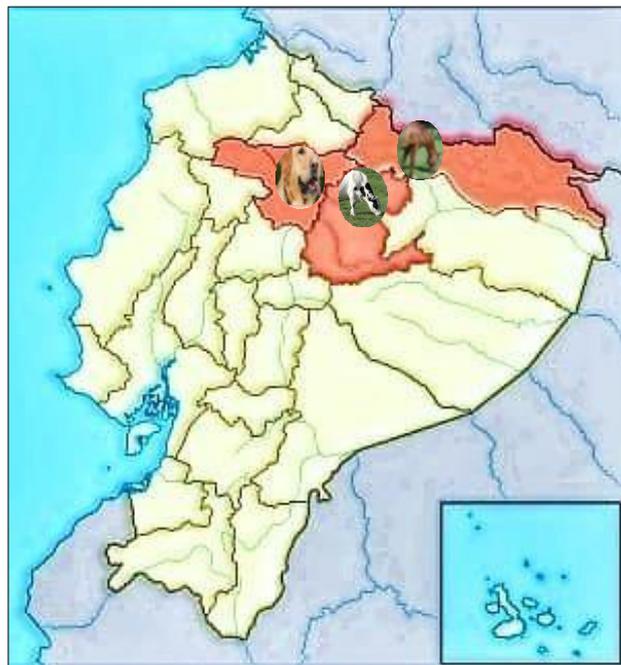
## Métodos

### Muestreo

## DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

Las muestras de ADN analizadas corresponden al proyecto “Artrópodos” realizado por el Centro de Investigación en Zoonosis – CIZ de la Universidad Central del Ecuador y facilitadas a la UISEK, con base en el convenio específico que sostienen ambas instituciones.

Se evaluaron 33 muestras entre equinos, caninos y bovinos de distintas parroquias, en dos provincias del Oriente ecuatoriano: la parroquia Gonzalo Díaz de Pineda en Napo (0°40'12"S, 77°56'24"W); y en Sucumbíos (0°5'0"S, 76°53'0"W), de los cuales 6 muestras de ADN eran pertenecientes a caninos, 8 a equinos y 6 a bovinos; y una de la Sierra: la parroquia Pedro Vicente Maldonado en Pichincha (0°10'0"N, 79°0'0"W); 13 muestras de ADN fueron de caninos, no hubo ADN que pertenezcan a equinos y bovinos . Estas regiones se encuentran ubicadas a una altitud promedio entre 500, 1500 y 620 m.s.n.m. (Figura 2) (INEC, 2014).



**Figura 2.**

La figura muestra la localización geográfica del área de estudio y hospedadores. Se señala las 3 provincias de estudio: Pichincha, Sucumbíos y Napo. Hospedadores:

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA YSUCUMBÍOS, ECUADOR**  
equinos, bovinos, caninos.

*Amplificación por PCR punto final*

Para la amplificación del ADN, se empleó PCR punto final, el volumen total de la reacción fue de 25ul, compuesto por: la Mezcla Maestra de PCR Promega® según recomendaciones de la casa comercial y tres sets de primers a una concentración de 0.25uM (según lo especificado por cada autor); los cebadores especie-específicos para *T. vivax* (CAT-L e ILO) y género– específico (ITS) para la familia *Trypanosomatidae* (Tabla 2). Los primers ITS1 CF/BR amplifican un fragmento del gen espaciador transcrito interno (ITS) del ADNr como lo describe (Njiru et al., 2005). Los primers ILO1264 F/ 1265R amplifican una región del gen que codifica a un antígeno específico de *T vivax* (Masake et al., 1997). Finalmente, los primers TviCatL/ DTO155 amplifican un fragmento del gen de la cisteína proteasa. Los programas de ciclado fueron escritos por (Njiru et al., 2005), (Masake et al., 1997) & Cortez et al., (2009), respectivamente. Los productos amplificados se analizaron a través de un gel de agarosa al 1,5% en electroforesis (45 minutos a 100V/ SafeView). Los amplicones obtenidos se cortaron de los geles y se purificaron usando el kit PureLink™ PCR Purification Kit de Thermo Fisher, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

**Tabla 2**

Cebadores utilizados en amplificaciones por PCR en el presente estudio

PRIMER	SECUENCIAS	PRODUCTO	REFERENCIA
ITS1 CF ITS1 BR	5´ CCGGAAGTTCACCGATATTG 3´ 5´ TTGCTGCGTTCTTCAACGAA 3´	250 pb	Njiru et al., 2005
TviCatL DTO155	5´ GCCATCGCCAAGTAC CTC GCC GA 3´ 5´ TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGAT CCA GTA 3´	177 pb	Cortez et al., 2009
ILO1264 F ILO 1265R	5´ CAGCTCGGCGAAGGCCACTTGGCTGGG-3´ 5´ -TCGCTACCACAGTCGCAATCGTCGTCTCAAGG-3	400 pb	Masake et al., 1994

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR

*Clonación de los productos de los amplicones.*

Los amplicones purificados fueron clonados en el vector p-GEM-T Easy de Promega siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Brevemente, la mezcla de ligación de cada amplicon se realizó con 5 uL de buffer de ligación, 1 uL del vector, 1 uL del producto de PCR purificado, 1 uL T4 ADN ligasa y 2 uL de agua ultra pura, para un volumen final de 10 uL. La ligación se dejó incubando a 4°C por 16 horas. Para la transformación, se emplearon las células competentes (Ready-to-Use) de la cepa JM109, con una mezcla que consistió en la mezcla de ligación junto con 50 uL de las células. El choque térmico fue de 10 min en hielo, 50 segundos a 42°C y una incubación por 10min de nuevo en hielo. Posteriormente, se añadieron 950 uL de medio Super Optimal Broth (SOC), y se incubó por 1 hora a 37°C. Por último, 100 uL de la mezcla fue sembrada en placa de agar al 1.5 % con IPTG, X-gal y ampicilina, a concentraciones estándar. A partir de las colonias blancas obtenidas, se realizó una PCR colony a un total de 4 colonias por placa. Los productos obtenidos fueron enviados a secuenciar a la empresa Macrogen, empleando los primers forward y reverse de cada amplicon. Las secuencias obtenidas a partir de los diferentes sets de cebadores y clones generados, fueron ensambladas en una secuencia consenso, usando GeneStudio Professional Edition (disponible en <http://www.genestudio.com>).

## *Análisis filogenético*

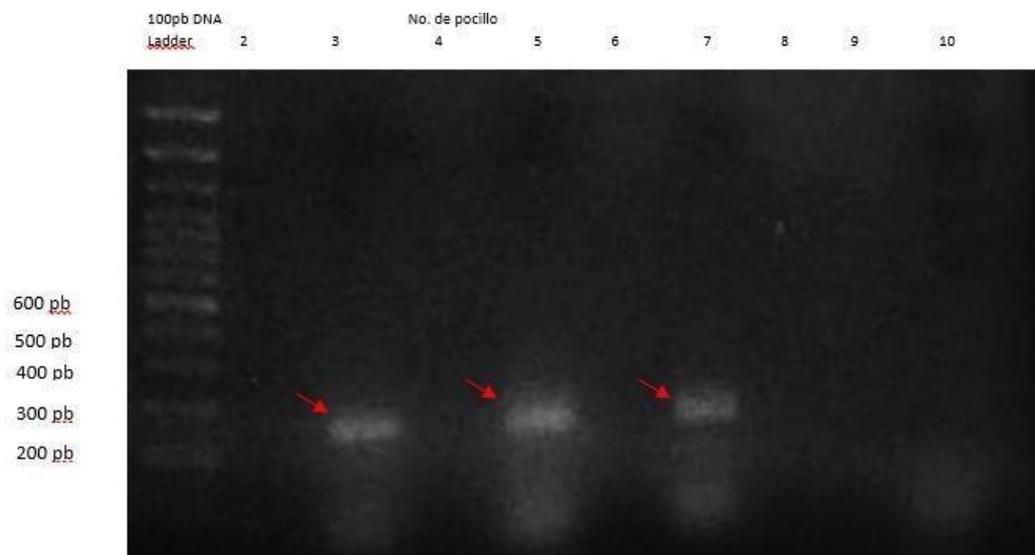
Las relaciones filogenéticas se determinaron mediante el análisis de las secuencias de la región ITS-1 y del dominio catalítico de catepsina L, extraídas en esta investigación, con otras obtenidas de la base de datos GenBank. Se realizó una alineación múltiple empleando el programa MEGA. Por último, se llevó a cabo las inferencias filogenéticas con el método de Máxima Parsimonia.

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

## Resultados

*Detección molecular de T. vivax utilizando los cebadores ITS1 CF/BR, TviCatL/DT0155 e ILO1264 F/1265R*

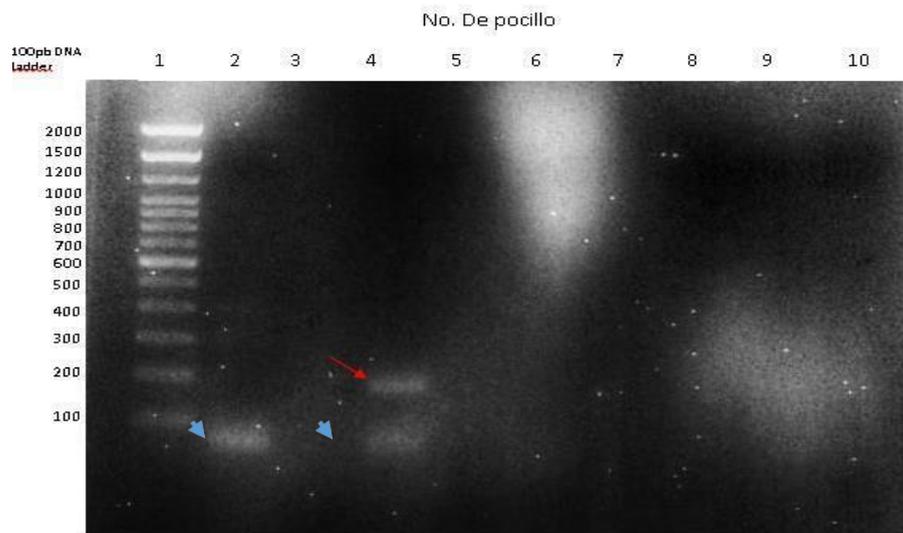
El ADN de 33 muestras perteneciente al Proyecto Artrópodos del CIZ se analizaron mediante PCR, empleando el conjunto de cebadores género- específicos ITS, y especie específicos catepsina L e ILO, para determinar e identificar la especie analizada. En las figuras 3, 4 y 5 se observan los productos de amplificación que se obtuvieron con PCR de las muestras provenientes de Pedro Vicente Maldonado, en la provincia de Pichincha y Aguas Negras en Sucumbíos. Las detecciones aplicando el conjunto de cebadores ITS CF/BR, muestran productos de amplificación de aproximadamente 250pb (Figura 3), indicando 6.06% de detección (2/33). Ambas muestras procedentes de un canino y un equino respectivamente. No se presentaron productos de amplificación en el control sin templado (pocillo 10).



**Figura 3.** Detección molecular de *T. vivax* aplicando los primers ITS1. Productos utilizando el conjunto de cebadores ITSCF/BR. La flecha roja señala los productos previstos de amplificación: Carril: 1, Marcador molecular de 100pb. 3, 5, 7, muestra 178 y 283, por triplicado. Carriles 2, 4, 6, 8,9 sin reacción; carril 10, control Negativo, reacción sin templado.

## DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

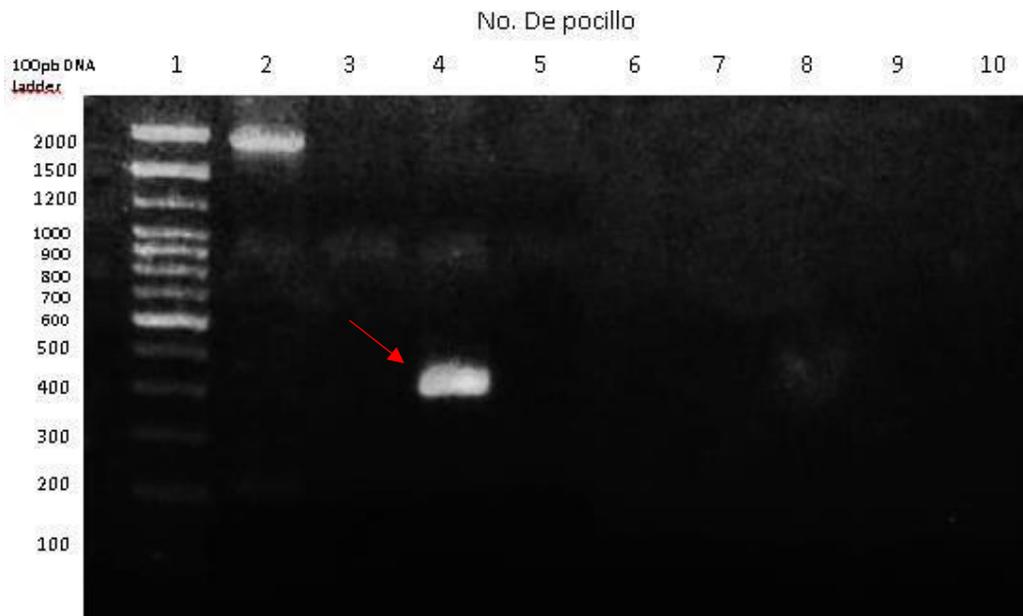
La detección aplicando el set de primers de catepsina L logró generar el mismo 6.06% de detección (2/33), para las muestras de campo anteriormente mencionadas. La figura 3 indica la amplificación de la muestra 178 de campo, mostrando una banda entre 100 y 200 pb cercano a lo descrito por (Cortez et al., 2009) (Figura 4, carril 4).



**Figura 4.** Detección de *T. vivax* por catepsina-L PCR. Con el conjunto de cebadores TviCatL/ DTO155. La flecha roja señala el producto entre 100 y 200 pb (muestra 178, POSITIVO). Carriles: 1 Marcador Molecular 100pb. Carriles: 2 (muestra 283 de campo, NEGATIVO) y 4 (muestra 178 de campo, NEGATIVO) se señalan bandas inferiores a 100pb (flecha azul) exceso de primer; carril 6 (muestra 187 de campo), carril 8 (muestra 191 de campo) y carril 10: reacción sin ADN.

La detección de *T. vivax* empleando los cebadores ILO1264/1265, específicos de la especie, fue de 6,06% (2/33), para las muestras de campo. Este conjunto de cebadores generó un producto esperano, mostrando una banda intensa de 400pb y a la vez amplicones más difusos dentro del estudio, con una cantidad de inespecificidades de la reacción, presentes como bandas de 1000pb y una banda intensa de 2000pb.

## DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR



**Figura 5.** Análisis electroforético de productos ILO-PCR. Resultados de gel de agarosa representativos que muestran el tamaño cercano a 400pb (POSITIVO) para *T. vivax* con set de primer ILO1264/1265-PCR. Los carriles indican: 1. Marcador de peso molecular; carril 2, muestra 191 de campo (NEGATIVO), carril 3 muestra 297 de campo (NEGATIVO), carril 4, muestra de ADN 283 de campo, carril 5, reacción sin ADN (CONTROL NEGATIVO).

### *Secuenciación*

En base a las secuencias obtenidas de cada clon extraídos con los diferentes conjuntos de cebadores, se obtuvieron un total de 5 contig, 3 para la porción ITS 1 denominada ANM283C1ITST<sub>v</sub>, ANM283C2ITST<sub>v</sub>, ANM283C3ITST<sub>v</sub>, 1 para la región catepsina L designada PVM178CATLT<sub>v</sub> y 1 para ILO, nominada ANM283ILT<sub>v</sub>.

La secuencia ANM283C1ITST<sub>v</sub> consenso de la región ITS- 1, muestra una longitud de 251pb y un promedio G/C de 60,56%. La longitud que muestra la secuencia

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

**PVM178CATL<sub>Tv</sub>** es de 195pb, presentando un porcentaje de G/C de 61,54%. La secuencia **ANM283IL<sub>Tv</sub>** obtenida mediante el conjunto ILO, tiene una longitud aproximada de 335pb, con un porcentaje de G/C de 61,79%.

La identidad de amplicones con las secuencias presentes en el GenBank, se evaluaron por BLAST. Para la región ITS-1 las secuencias muestran un porcentaje de identidad para la misma especie pero diferentes hospedadores y países del 100% (Tabla 3), entre las secuencias de estudio y la de la base de datos, siéndola mayoría de países Africanos y presentes también en Sudamérica, se puede observar que el hospedero más común en este caso es el camello, seguido del ganado tanto equino como bovino. Para la región similar a catepsina L se obtuvo entre un 99.44 y 100% de identidad (Tabla 4), siendo el 100% en países sudamericanos y en un menor porcentaje los países de África Oriental.

**Tabla 3.** Correlación entre la secuencia *ANM283CIITST<sub>v</sub>* mediante ITS-1 con secuencias de la base de datos.

<b>Secuencia</b>	<b>Hospedador</b>	<b>Localización</b>	<b>Porcentaje de identidad</b>	<b>Acceso GenBank</b>
<i>Trypanosoma vivax</i>	Camelus	Kenia	100	MH247145.2
	Camelus	Kenia	100	MH247149.2
<i>ANM283CIITS<sub>Tv</sub></i>	Camelus	Kenia	100	MK880188.1
	<i>Hippobosca camelina</i>	Kenia	100	MK880189.1
	Bovine	Burkina	100	JX910372.1
	Equus	Paraguay	100	LC589626.1

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

**Tabla 4.** Comparación de la secuencia de *T. vivax* mediante Catepsina-L con secuencias de GenBank

Secuencia	Hospedador	Localización	Porcentaje de identidad	Acceso GenBank
<i>Trypanosoma vivax</i> PVM178CATL Tv	Bovine	Ecuador	100	MT547173.1
	Bovine	Ecuador	100	MT547174.1
	<i>Bos taurus</i>	Brasil	100	KR822724.1
	<i>Ovis aries</i>	Brasil	100	KR822728.1
	<i>Equus asinus</i>	Brasil	100	KR822720.1
	Camelus	Sudan	96,47	LC198233.1
	Cattle	Mozambique	96,61	EU753808.1
	Goat	Mozambique	99,44	UE753816.1

La secuencia estudiada con ILO de *T. vivax*, mostró una similitud un 98.5 (estudio realizado por Masake) y 99.7% (publicación por mismo autor, años antes), adicional la tabla 5 muestra las escasas de secuencias y datos presentes en la base del GenBank.

**Tabla 5.** Comparación de la secuencia de *T. vivax* mediante ILO, con secuencias de GenBank

<i>Trypanosoma vivax</i> ANM283ILTv	Porcentaje de identidad	Acceso GenBank
<i>Trypanosoma vivax</i> (Masake et al., 1994)	99.70	L25129.1
<i>Trypanosoma vivax</i> (Jackson et al., 2012)	99.11	HE573027.1
<i>Trypanosoma vivax</i> (Masake et al., 1997)	98.50	U43183.1

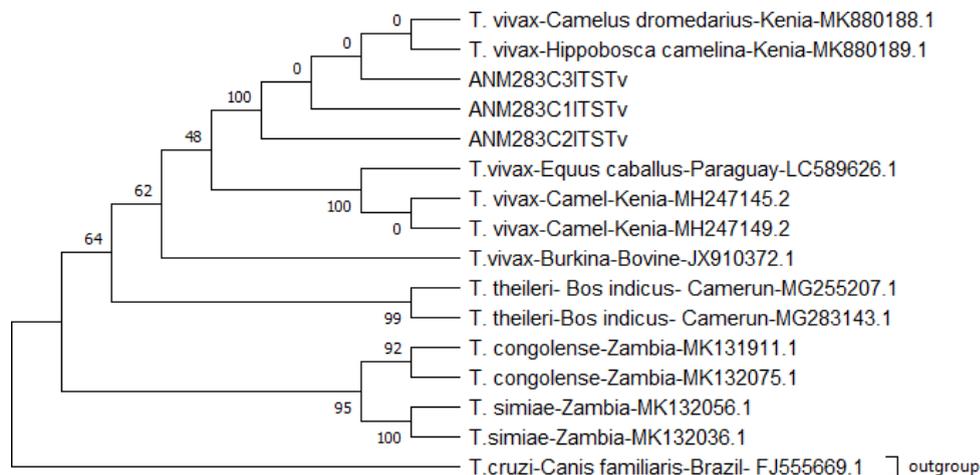
*Análisis filogenético*

Los aislamientos de *T. vivax* en Aguas Negras en Sucumbíos y Pedro Vicente Maldonado en Pichincha (Ecuador) mostraron una relación cercana con las secuencias reportadas en Sudamérica y África.

## DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

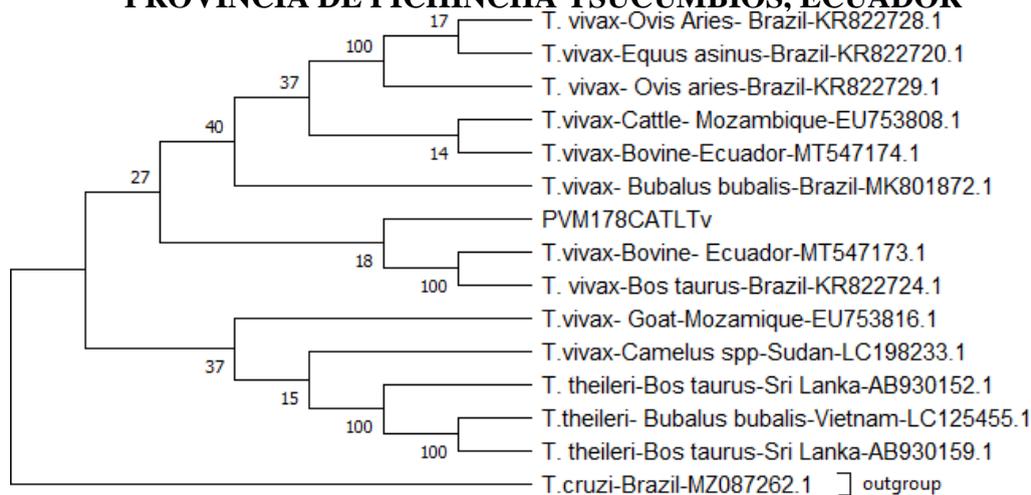
La filogenia que emplea secuencias con ITS-1 (Figura 6), colocó todos los aislamientos de *T. vivax* unidos en un mismo clado. Se observó en clados más lejanos a otras especies de tripanosomas como son *T. theileri*, *T. congolense*, *T. simiae*, el *T. cruzi* al ser el más apartado se encuentra en la raíz del árbol.

Los resultados de los análisis filogenéticos empleando la región similar a tipo catepsina L, colocó todos los aislamientos de *T. vivax* Sudamericanos en un mismo clado, mientras que en la otra rama del árbol se encuentran las secuencias de tripanosomas reportados en África y Asia (Figura 7).



**Figura 6.** Filogenia de máxima parsimonia de *Trypanosoma vivax* basado en la región ITS-1. Se muestra la especie de *Trypanosoma*, la localización y el hospedero. Las secuencias de esta investigación se muestran como ANM283C1ITSTv, ANM283C2ITSTv, ANM283C3ITSTv. El árbol está enraizado en la secuencia de grupo externo *T. cruzi*

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**



**Figura 7.** Inferencia filogenética utilizando máxima parsimonia de *Trypanosoma vivax* basado en la región similar a catepsina L. Se indica la especie de *Trypanosoma* (*T. vivax*, *T. theileri*, *T. cruzi*), país y el hospedero. La secuencia de esta investigación denominada PVM178CATLTV. El árbol tiene su raíz en la secuencia de grupo externo *T. cruzi*

### Discusión

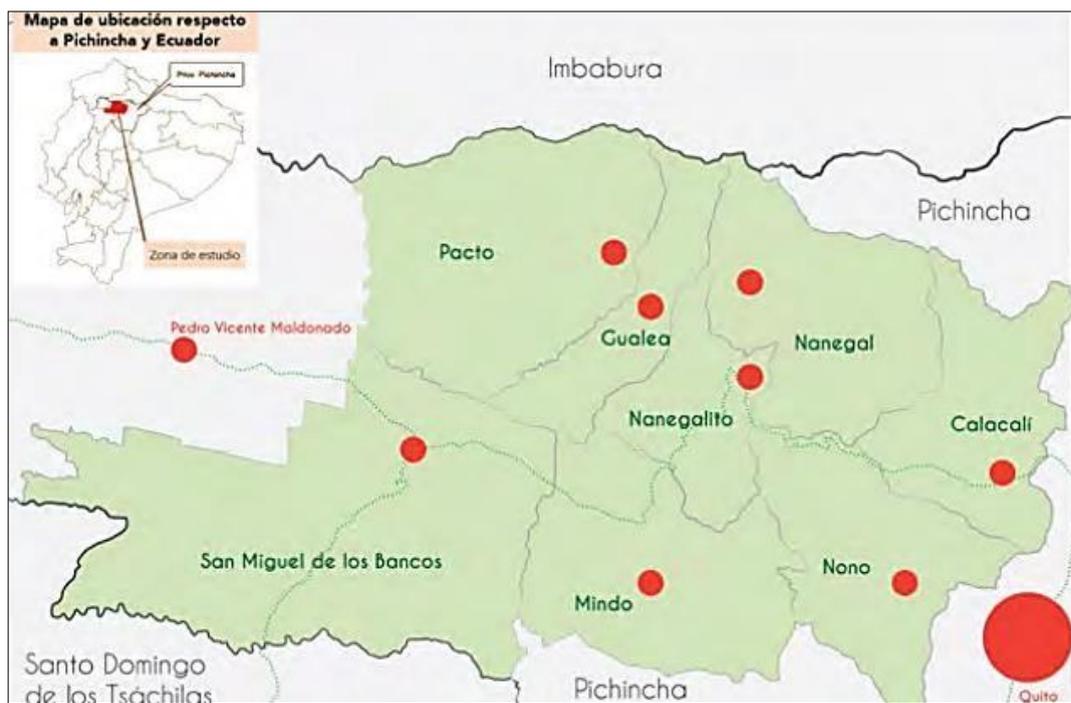
Este estudio evidenció la presencia de *T. vivax* en Sucumbíos y Pichincha en la zona ecuatoriana, siendo, hasta el momento, el primer estudio científico de este parásito en estas regiones, empleando herramientas moleculares. De las 33 muestras analizadas, 2 resultaron positivas a los 3 cebadores, con una detección del 6.06% con productos de amplificación cercanos a lo reportado para cada uno de los marcadores moleculares ITS, catepsina L e ILO.

La prevalencia obtenida en este estudio, es relativamente baja en comparación a los estudios antes descritos. La diferencia de cifras alcanzadas con las reportadas a nivel nacional puede ser el resultado de ciertos factores, entre ellos, el tamaño de la población evaluada, puesto que fue seleccionado un bajo número de muestras para el estudio, cabe destacar que Pichincha cuenta con aproximadamente 363.112 cabezas de ganado bovino y 21.021 de ganado caballar, pudiéndose realizar un estudio con mayor número de muestras, Sucumbíos cuenta con 85.545 cabezas de bovinos y 6.456 ganado

## DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR

equino, siendo Sucumbíos una de las provincias del Oriente Ecuatoriano con menor número de animales de interés pecuario.

La variación de prevalencia, podría deberse al escaso número de localidades seleccionadas para el estudio, tomando en cuenta que Pedro Vicente Maldonado representa el 30,31% de la provincia de Pichincha con una extensión de 286.805 hectáreas (Cabezas et al., 2019) (Figura 8) y Aguas Negras tiene una superficie de 45.396,84 hectáreas, y en estudios como el realizado por (Chávez-Larrea et al., 2020), la zona de estudio representa el 16.1% del territorio de la provincia de Manabí con aproximadamente 3'100.000 hectáreas (INEC,2010).



**Figura 8** (Cabezas et al., 2019)

### **Mapa de ubicación de Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha.**

Punto rojo señala zona poblada, línea negra intensa: límite de provincias; línea negra difusa: límite entre parroquias; línea verde entrecortada: vía principal

Esta técnica ha sido utilizada para identificar *T. vivax* en diferentes especies animales, como el canino identificado en este estudio, donde se encontró un genotipo similar en bovinos (Chávez-Larrea et al., 2020).

## **DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

Los perros de finca son un apoyo como guardianes y pastores, en este estudio se observó que existe una introducción de poblaciones vulnerables a *T. vivax*, eso quiere decir que este parásito no solo encuentra afectando a ganado vacuno, dromedario, cabras, ovejas, caballos, burros, como se hace mención al inicio, sino que hay riesgo de infección por este *Trypanosoma* en otro tipo de hospedadores como los caninos, significando que existen otros animales que van a participar en el ciclo de transmisión de este parásito.

El análisis filogenético de Máxima Parsimonia en los aislamientos obtenidos en el estudio mostró una similitud con aislados de Sudamérica (Paraguay) y África oriental (Kenia) en el caso de ITS-1, con lo que se confirma que las secuencias obtenidas en este estudio pertenecen a la de un *T. vivax*. El aislamiento obtenido con la región similar a Cat-L, mostró una estrecha relación con los aislados del estudio de (Chávez-Larrea et al., 2020), esto podría estar asociado a la presencia del vector, o a su vez a la facilidad del movimiento de animales de un lugar a otro.

### **Conclusiones**

Esta investigación muestra, el primer reporte de la presencia de *T. vivax* en 2 provincias del Ecuador (Pichincha y Sucumbíos) detectado mediante PCR y confirmado con la secuenciación de los diferentes marcadores: ITS-1, CATL, ILO, en Ecuador. Ecuador cuenta con regiones tropicales o subtropicales que tiene un ambiente óptimo para poder desarrollarse el parásito. En Ecuador no existe estudio alguno que muestre la presencia de *T. vivax* en un *canis lupus familiaris*, dejando un gran precedente para futuras investigaciones. La presencia de *T. vivax* en caninos y equinos, implica otros riesgos, porque se demostró que existe la participación de otros animales en el ciclo de transmisión de este agente etiológico. Estimar la prevalencia de *T. vivax* junto a los

# DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR

factores de riesgo asociados y la caracterización de los vectores potenciales para la transmisión, son un potencial paso a dar para la determinación de programas de vigilancia y controles epidemiológicos para la tripanosomosis en Ecuador.

## Recomendaciones

Se recomienda realizar estudios con una mayor población de animales, para lograr establecer datos preliminares dentro de un rango de confianza más concreto, y así disminuir el nivel de incertidumbre con respecto a los indicadores epidemiológicos. Adicional se debería realizar investigaciones sobre la presencia de vectores para definir más concretamente los riesgos asociados a la existencia de esta enfermedad en la zona de estudio. Es recomendable llevar a cabo un análisis sobre el posible impacto económico, el cómo la clínica de los animales estaría afectando en este aspecto.

## Bibliografía

- Bastos, T. S. A., Faria, A. M., Couto, L. F. M., Nicaretta, J. E., Cavalcante, A. S. D. A., Zapa, D. M. B., Ferreira, L. L., Heller, L. M., Madrid, D. M. D. C., Cruvinel, L. B., Rossi, G. A. M., Soares, V. E., Cadioli, F. A., & Lopes, W. D. Z. (2020). Epidemiological and molecular identification of *Trypanosoma vivax* diagnosed in cattle during outbreaks in central Brazil. *Parasitology*, *147*(12), 1313–1319. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001006>
- Buestán, J., Biol, A., Navarrete, R., Mejia, M., & Biol, T. (2007). LISTA ACTUALIZADA DE TÁBANOS (DIPTERA: TABANIDAE) DEL ECUADOR. *REV ECUAT HIG MED TROP*, *44*.
- 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

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR**

cattle population from Ecuador . *Transboundary and Emerging Diseases*.

<https://doi.org/10.1111/tbed.13906>

Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44–51.  
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>

Dávila, A. M. R., Herrera, H. M., Schlebinger, T., Souza, S. S., & Traub-Cseko, Y. M. (2003). Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 117(1–2), 1–13.  
<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2003.08.002>

Eleizalde, M. C., Ramírez-Iglesias, J. R., 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>

Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites and Vectors*, 14(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x>

Gaithuma, A. K., Yamagishi, J., Martinelli, A., Hayashida, K., Kawai, N., Marsela, M., & Sugimoto, C. (2019). A single test approach for accurate and sensitive detection and taxonomic characterization of trypanosomes by comprehensive analysis of internal transcribed spacer 1 amplicons. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(2).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006842>

Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., Aso, P. M., & Reyna-Bello, A. (2014).

*Trypanosoma (duttonella) vivax* and typanosomosis in latin America:

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR**

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

[https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\\_11/FIGURES/00113](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11/FIGURES/00113)

INEC. (2014). *Encuesta de Producción Agropecuaria Continua*.

<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-produccion-agropecuaria-continua/>

Jackson, A. P., Berry, A., Aslett, M., Allison, H. C., Burton, P., Vavrova-Anderson, J., Brown, R., Browne, H., Corton, N., Hauser, H., Gamble, J., Gilderthorp, R., Marcello, L., McQuillan, J., Otto, T. D., Quail, M. A., Sanders, M. J., Van Tonder, A., Ginger, M. L., ... Berriman, M. (2012). Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(9), 3416–3421. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1117313109/-/DCSUPPLEMENTAL/SM01.SWF>

Masake, R. A., Majiwa, P. A. O., Moloo, S. K., Makau, J. M., Njuguna, J. T., Maina, M., Kabata, J., Ole-MoiYoi, O. K., & Nantulya, V. M. (1997). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*, 85(2), 193–205.

<https://doi.org/10.1006/expr.1996.4124>

Masake, R. A., Nantulya, V. M., Pellé, R., Makau, J. M., Gathuo, H., & ole-MoiYoi, O. K. (1994). A species-specific antigen of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially expressed tandemly reiterated gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 64(2), 207–218. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(94\)00011-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00011-5)

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBIOS, ECUADOR**

Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L. M., Campos, A. M.,

Washington, J., Román, R., Moyano, J. C., Jarrín-Porras, C., Dayan Sandoval-Morejón, E., & Augusta Chávez-Larrea, M. (2017). Diagnosis of *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. by *ELISA* and *PCR* techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista Científica*, 162–171.

Mendoza, M., & Eleizalde, M. C. (2021). *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports Evaluation of five primer sets for molecular detection of Trypanosoma vivax by polymerase chain reaction ( PCR ) and their implementation for diagnosis in naturally infected ruminants from Venezuela.* 25(July 2020). <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100594>

Nakamura, Y., Hayashida, K., Delesalle, V., Qiu, Y., Omori, R., Simuunza, M., Sugimoto, C., Namangala, B., & Yamagishi, J. (2021). Genetic Diversity of African Trypanosomes in Tsetse Flies and Cattle From the Kafue Ecosystem. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 599815. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.599815>

Njiru, Z. K., Constantine, C. C., Guya, S., Crowther, J., Kiragu, J. M., Thompson, R. C. A., & Dávila, A. M. R. (2005). The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitology Research*, 95(3), 186–192. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1267-5>

Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Da Costa, S. C. G. (2008). *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: Its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - A review. In *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 103, Issue 1, pp. 1–13). Fundacao

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**

Oswaldo Cruz. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>

Reis, M. de O., Souza, F. R., Albuquerque, A. S., Monteiro, F., Oliveira, L. F. D. S., Raymundo, D. L., Wouters, F., Wouters, A. T. B., Peconick, A. P., & Varaschin, M. S. (2019). Epizootic infection by *trypanosoma vivax* in cattle from the state of Minas Gerais, Brazil. *Korean Journal of Parasitology*, 57(2), 191–195. <https://doi.org/10.3347/kjp.2019.57.2.191>

Silva Pereira, S., de Almeida Castilho Neto, K. J. G., Duffy, C. W., Richards, P., Noyes, H., Ogugo, M., Rogério André, M., Bengaly, Z., Kemp, S., Teixeira, M. M. G., Machado, R. Z., & Jackson, A. P. (2020). Variant antigen diversity in *Trypanosoma vivax* is not driven by recombination. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14575-8>

Takeet, M. I., Fagbemi, B. O., Peters, S. O., DeDonato, M., Yakubu, A. M., Wheto, M., & Imumorin, I. G. (2017). Genetic diversity among *Trypanosoma vivax* strains detected in naturally infected cattle in Nigeria based on ITS1 of rDNA and diagnostic antigen gene sequences. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(2), 433–441. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0822-1>

Vieira, O. L. E., de Macedo, L. O., Santos, M. A. B., Silva, J. A. B. A., de Mendonça, C. L., da Gloria Faustino, M. A., do Nascimento Ramos, C. A., Alves, L. C., Ramos, R. A. N., & de Carvalho, G. A. (2017). Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 26(4), 516–520. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017048>

Wells, E. A., Betancourt, A., & Ramirez, L. E. (1977). The epidemiology of *Trypanosoma vivax* in Latin America: some results from the use of an

**DETECCIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICOS DE *Trypanosoma vivax* EN EQUINOS Y CANINOS NATURALMENTE INFECTADOS, EN PARROQUIAS DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA Y SUCUMBÍOS, ECUADOR**  
indirect fluorescent antibody test. Journal of Protozoology, 24, 41A-2A.