



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha,
Ecuador”

Realizado por:

Esteban Javier De la Cadena Flores

Director del proyecto:

PhD. José Rubén Ramírez

Como requisito para la obtención del título de:

MÁSTER EN BIOMEDICINA

Quito, 04 octubre 2021

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, ESTEBAN JAVIER DE LA CADENA FLORES, con cédula de identidad 171809828-6, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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



Esteban Javier De la Cadena Flores

C.I. 171809828-6

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE *TRIPANOSOMA THEILERI* EN BOVINOS
DE LA PARROQUIA DE LIMONCOCHA, ECUADOR”**

Realizado por:

ESTEBAN JAVIER DE LA CADENA FLORES

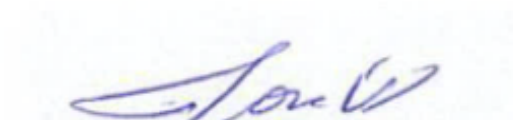
como Requisito para la Obtención del Título de:

MÁSTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



PhD. José Rubén Ramírez

DIRECTOR

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores informantes:

PhD. Juan Carlos Navarro

PhD. Lino Arisqueta

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



REVISOR



REVISOR

Quito, 04 de octubre 2021

AGRADECIMIENTO

A mi esposa, mi madre y mis hijos, que han sabido apoyarme para cumplir mis más anheladas metas.

A mis profesores y a la universidad por haberme guiado en todo el proceso educativo y en la realización de esta investigación.

Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha, Ecuador

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación

Salud Global (Global Health)

Y con el financiamiento del proyecto titulado:

**Prevalencia de la tripanosomosis en animales de interés pecuario en la región costa y
oriente de Ecuador.**

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

DII-UISEK- P031920

Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha, Ecuador

04/10/2021

Para someter a:

To be submitted:

Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos del Oriente Ecuatoriano

Esteban De la Cadena¹, Juan Carlos Navarro¹, José Rubén Ramírez Iglesias*¹

¹Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador

04/10/2021

* AUTOR DE CORRESPONDENCIA: José Rubén Ramírez, PhD. Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador.

Teléfono: +593-0986391273; email: jose.ramirez@uisek.edu.ec

Título corto o Running title:

Tripanosomosis por *Trypanosoma theileri* en Ecuador

Resumen

La Tripanosomosis es una enfermedad hemoparasitaria, ocasionada por las especies del género *Trypanosoma*, los cuales son parásitos protozoarios de la familia *Trypanosomatidae*. Varias especies de tripanosomas son conocidos agentes infecciosos de varios animales salvajes y domésticos a nivel mundial, como *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma theileri*, los cuales son de importancia médica y veterinaria en Sur América. Entre las diferentes especies, *T. theileri* es la menos estudiada, probablemente de debido a la naturaleza, por lo general, no patógena descrita del parásito.

El presente estudio se realizó en la parroquia de Limoncocha, provincia de Sucumbios en 15 muestras de ganado bovino, utilizando la técnica de PCR mediante la identificación de tres primers (ITS, 18S y CATL), obteniéndose una prevalencia de resultados positivos para *T. theileri* de 26.6 % (4/15) con ITS, y 20% (3/15) con los primers 18S y Catepsina L; con lo que se pudo obtener mediante secuenciación 7 contigs para la identificación de *T. theileri* y su análisis filogénico, utilizando secuencias clones de CATL relacionadas con diversos estudios similares de la misma especie; lo que nos llevó determinar que *T. theileri* se encuentra presente en la zona de estudio, permitiéndonos identificar por primera vez en el Ecuador su relevancia epidemiológica.

Palabras clave: Tripanosomosis, *Trypanosoma theileri*, bovinos, PCR, primers, secuenciación, filogénia.

Abstract

Trypanosomosis is a hemoparasitic disease, caused by the species of the genus *Trypanosoma*, which are protozoan parasites of the *Trypanosomatidae* family. Several species of *trypanosomes* are known infectious agents of various wild and domestic animals worldwide, such as *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma theileri*, which are of medical and veterinary importance in South America. Among the different species, *T. theileri* is the least studied, probably due to the generally described non-pathogenic nature of the parasite.

The present study was carried out in the parish of Limoncocha, Sucumbios province in 15 samples of cattle, using the PCR technique by identifying three primers (ITS, 18S and CATL), obtaining a prevalence of positive results for *T. theileri* 26.6% (4/15) with STI, and 20% (3/15) with primers 18S and Cathepsin L; with which it could be obtained by contig sequencing for the identification of *T. theileri* and its phylogenic analysis, using CATL clone sequences related to several similar studies of the same species; This led us to determine that *T. theileri* is present in the study area, allowing us to identify its epidemiological relevance for the first time in Ecuador.

Keywords: Trypanosomosis, *Trypanosoma theileri*, bovines, PCR, primers, sequencing, phylogenesis.

Introducción

La Tripanosomosis es una enfermedad hemoparasitaria, ocasionada por las especies del género *Trypanosoma*, los cuales son parásitos protozoarios de la familia *Trypanosomatidae*. Varias especies de tripanosomas son conocidos agentes infecciosos de varios animales salvajes y domésticos a nivel mundial, como *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma theileri*, los cuales son de importancia médica y veterinaria en Sur América (Osório et al., 2008; Amato et al., 2019). Entre las diferentes especies, *T. theileri* es la menos estudiada, probablemente debido a la naturaleza, por lo general, no patógena descrita del parásito (Baticados et al., 2010).

T. theileri es un hemoprotozoario cosmopolita, el cual tiene como principales hospedadores a los rumiantes y algunos artiodáctilos domésticos y salvajes, incluidos búfalos, ovejas, cabras, antílopes y ciervos (Desquesnes, 2004; Rodrigues et al., 2010). Pertenece a la sección Stercoraria de tripanosomátidos, los cuales se caracterizan por el estadio final del desarrollo en el tracto digestivo del vector, lo que facilita su transmisión por la contaminación con las heces del vector insecto infectado (Schuster y Sachaub. 2000). A pesar de esto, su modo de transmisión no está enteramente entendida, por lo que también se ha propuesto que ocurre de forma mecánica por moscas de los géneros *Haematopota*, *Hybomitra*, *Tabanus* y *Culicoides* o garrapatas del género *Hyalomma anatolicum anatolicum* e *Ixodes* (Latif et al., 2004).

Posee una distribución global, la cual corresponde a un grupo filogenéticamente relacionado de tripanosomas aislados de los rumiantes, clasificados dentro del subgénero *Megatripanum* de la sección Stercoraria, junto con otras especies no patógenas de tripanosomas en los rumiantes como: *Trypanosoma stefanskii*, *Trypanosoma melophagium* (oveja), *Trypanosoma theodori* (cabras), *Trypanosoma cervi* (ciervo) y otros tripanosomas silvestres de rumiantes (Suganuma et al., 2019) (Calzolari et al., 2018).

T. theileri induce una infección crónica y críptica que puede llegar a ser potencialmente patogénica para los animales que están bajo afectación física severa o estrés emocional, recién nacidos, en estado de gestación y cuando se asocia a otras enfermedades infecciosas recurrentes. En la mayoría de los casos, las infecciones por *T. theileri* persisten por largos periodos de tiempo sin ningún signo clínico (García et al., 2011). A su vez, se debe considerar que la enfermedad al ser asintomática puede estar presente por años, hasta que esta pueda ser detectada en la sangre periférica o hasta que se haga evidente una anemia crónica que esta puede causar. Sin embargo, se debe considerar que la infección por otros hemoparásitos aumenta la patogenicidad de *T. theileri* provocando en ocasiones abortos y muerte en terneros (Rodríguez Gómez, 1964).

Esta especie se puede distinguir de otros tripanosomas mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos mediada por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) dirigidos a genes ribosomales (Villa et al., 2008). Varios marcadores genéticos tales como la subunidad pequeña rRNA (ssrRNA), espaciador interno del transcrito 1 (ITS 1) y la proteína similar a la catepsina (CATL) son usados para analizar la variación genética en los parásitos *T. theileri* de varios hospedadores animales como bovinos, búfalos y ciervos (Yokoyama et al., 2015). A pesar de la disponibilidad de herramientas moleculares, la presencia de *T. theileri* en Sur América ha sido escasamente estudiada, mientras que en Ecuador no existe información, a pesar de que se le considera como un parásito cosmopolita (Desquesnes, 2004). En Suramérica, se han realizado estudios en animales de interés pecuario pertenecientes a Brasil y Venezuela, en los cuales se ha descrito una prevalencia de *T. theileri* que oscila entre el 5 y 30% (García et al. 2011b).

En el Ecuador, la ganadería es una de las actividades más representativas del sector de la agricultura, con aproximadamente 4.1 millones de cabezas de ganado distribuidos en las

Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha, Ecuador

cuatro regiones: en la sierra 48.4% (ganado lechero), en la región costa 42.4% (ganado de doble propósito, carne y leche) y 9.13% en el oriente y región insular (Chávez-Larrea et al., 2021). Con base en esta actividad económica predominante, se hace necesaria la realización de estudios que permitan conocer la situación de estos agentes infecciosos causantes de enfermedades desatendidas u oportunistas como la tripanosomosis inducida por *T. theileri*. Los rasgos moleculares reportados apoyan la realización de futuros estudios epidemiológicos para entender los genotipos de los parásitos que se presentan en la circulación de sus hospedadores mamíferos. También resulta importante para introducir programas de vigilancia para este parásito y sus vectores, entendiendo su potencial rol como agente patógeno en animales saludables y su impacto económico en las granjas y criaderos de ganado (Amato et al., 2019) e implementar estrategias de diagnóstico y control en la zona de estudio, permitiendo disminuir la transmisión del parásito a bovinos sanos y protegiendo a la industria ganadera del país. Es por ello que el objetivo de este trabajo de investigación fue la identificación molecular de *T. theileri* en bovinos procedentes de pequeñas unidades de producción de la parroquia de Limoncocha, en la provincia de Sucumbíos, Ecuador.

Materiales y métodos

Material biológico

El muestreo se realizó durante el mes de noviembre del año 2019, a un total del 10 % de los rebaños bovinos pertenecientes a 3 fincas de producción agropecuaria, ubicadas en la parroquia de Limoncocha, cantón Shushufindi, provincia de Sucumbíos, en la región amazónica del Ecuador. Un total de 15 animales fueron muestreados, mediante la obtención de 5 mL de sangre en presencia de heparina, a partir de la vena coccígea de la cola. El ADN total fue extraído en los laboratorios de la UISEK, presentes en la Reserva Biológica de Limoncocha y fueron enviadas a las instalaciones de la Universidad Internacional SEK, ubicadas en la ciudad de Quito, para ser procesadas en sus laboratorios de investigación.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

La extracción de ADN se realizó empleando el kit de Wizard™ de Promega, siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Posteriormente, se cuantificó la concentración de ADN obtenida en cada una de las muestras mediante el kit de Invitrogen Qubit “dsDNA BR Assay Kit, 500 assays”, en el equipo de invitrogen Qubit 2.0 Fluorometer. El ADN extraído fue almacenado a -20 °C para su posterior uso.

Para realizar la PCR de las muestras, se utilizaron 3 sets de primers, los cuales amplifican regiones asociadas a los espaciadores internos transcritos 1 (ITS1 CF/BR), ADN ribosomal 18S (609F y 709R) de la misma región y la subunidad catalítica de la proteasa tipo catepsina (Tth F y DTTO R) (Tabla 1). Las mezclas de reacción y los programas de ciclado se implementaron según las referencias descritas para cada primer. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25uL, en un termociclador MiniAmp Plus™ Thermal Cycler y empleando 100 ng de ADN total.

Tabla 1. Lista de los primers utilizados para la detección y genotipificación *T. theileri*.

Región diana	Primer	Secuencia	Tamaño relativo del amplicón	Referencia
ITS1	Forward (ITS CF)	5'-CCG GAA GTT CAC CGA TAT TG-3' 5'-TTG CTG CGT TCT TCA ACG AA-3'	396 bp	Njiru <i>et al.</i> 2006
Región V7-V8 de 18S ARNr	Forward (609F) Reverse (706R)	5'-CAC CCG CGG TAA TTC CAG C-3' 5'-CTG AGA CTG TAA CCT CAA -3'	876 bp	Da Silva <i>et al.</i> 2004
Núcleo catalítico de proteína tipo Catepsina	TthCATL1 DIO155	5'-CGT CTC TGG CTC CGG TCA AAC-3' 5'-TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT GAT CCA GTA-3'	289 bp	Rodrigues <i>et al.</i> 2010

Los productos de amplificación fueron revelados mediante geles de agarosa al 1.5 % preparados en tampón TAE, con de Safe View Classic (abm) a una dilución 1/10000, para la tinción de ácidos nucleicos. En el primer pocillo de los geles se depositó el marcador molecular (Ladder) de 100pb (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Los amplicones resultantes se purificaron empleando el kit de Invitrogen PureLink “Quick PCR Purification Kit”, según el protocolo establecido por la casa comercial.

Clonación 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 amplicón 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 10 min 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 (contigs), usando GeneStudio Professional Edition (disponible en <http://www.genestudio.com>). La longitud de los contigs, así como su % guanina-citocina (%G/C) se determinó por medio del servidor Biologics International Corporation. (<https://www.biologicscorp.com/tools/GCContent/>). El alineamiento de las secuencias clones y las matrices de los porcentajes de identidad, se realizaron mediante el programa Multiple Alignment using Fast Fourier Transform o MAFFT (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>).

Análisis filogenéticos

Las secuencias procedentes de los clones obtenidos fueron introducidas en el servidor BLAST (Basic Local Alignment Search Tool / <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) del NCBI, para obtener coincidencias con secuencias de tripanosomátidos de diferentes localidades y hospedadores presentes en la base de datos del GenBank.

Las inferencias filogénicas fueron valoradas usando máxima parsimonia (MP).

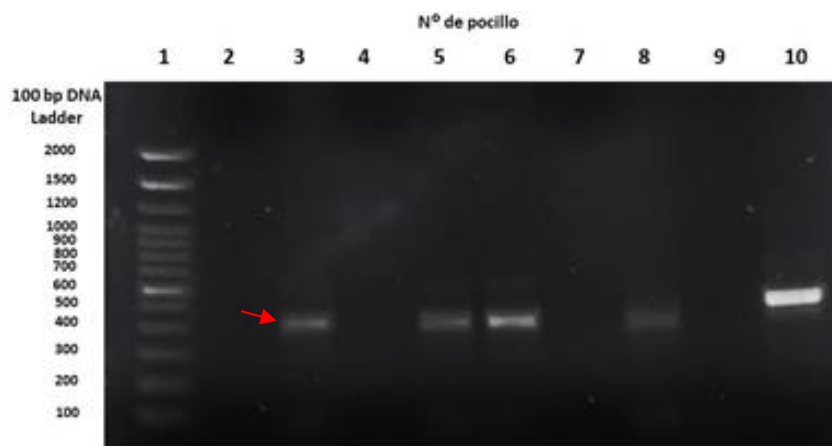
Resultados

Detección molecular de T. theileri y establecimiento de prevalencia

El ADN de las 15 muestras fue analizado por PCR, utilizando los primers género específicos ITS, y especie específica 18S y tipo catepsina, para determinar la prevalencia e identificación de la especie en estudio. En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los productos de

amplificación obtenidos mediante PCR de las muestras recolectadas en el sector de Limoncocha, provincia de Sucumbíos. En el caso de las detecciones empleando los primers ITS CF/BR, se puede observar un producto de amplificación de aproximadamente 400 pb para las muestras positivas, lo cual indica un 26.6 % de detección (4/15) (Figura 1). La muestra 9 de campo presenta la mayor intensidad de amplificación, mientras que el resto de positivos presenta amplicones más difusos. De igual forma, se observan bandas adicionales, posiblemente asociadas a inespecificidades en la reacción de PCR, lo cual motivó a cortar las bandas para realizar el proceso de clonación y secuenciación.

Figura 1. Detección molecular de *T. theileri* empleando los primers ITS1. Productos de PCR empleando el set ITSCF/BR. La flecha roja muestra los productos esperados de amplificación. Carriles: 1, Marcador de 100 pb. 3, 5, 6 y 8, muestras de campo 4, 7, 9 y 12 respectivamente. 9, control sin templado. 10, control positivo (480 pb) del aislado de *T. equiperdum*, TeAp-ND1.



La detección molecular empleando los primers 18S (Figura 2) y tipo catepsina (Figura 3) lograron generar un 20 % de detección (3/15), para todas las muestras de campo. Esta detección fue en casi las mismas muestras de campo positivas a ITS, con excepción de la muestra 4 para la región 18S y la 9 para la región tipo catepsina. De todos los primers utilizados,

los dirigidos contra la porción V7-V8 del 18S generaron los amplicones más difusos dentro del estudio, junto con una mayor cantidad de inespecificidades de la reacción, mostradas como bandas de tamaño superior a 2000 pb y menores a 500 pb, adicionales al producto esperado, cercano a 900 pb. Las amplificaciones de la región del núcleo catalítico tipo catepsina muestran bandas intensas cercanas a las 300 pb, y sin inespecificidades aparentes.

Figura 2. Detección molecular de *T. theileri* empleando los primers 18S. Productos de PCR empleando el set 609F y 706R. La flecha roja muestra los productos esperados de amplificación. Carriles: 1, Marcador de 100 pb. 3, 5, 7 y 9, muestras de campo 4, 7, 9 y 12 respectivamente. 10, control sin templado.

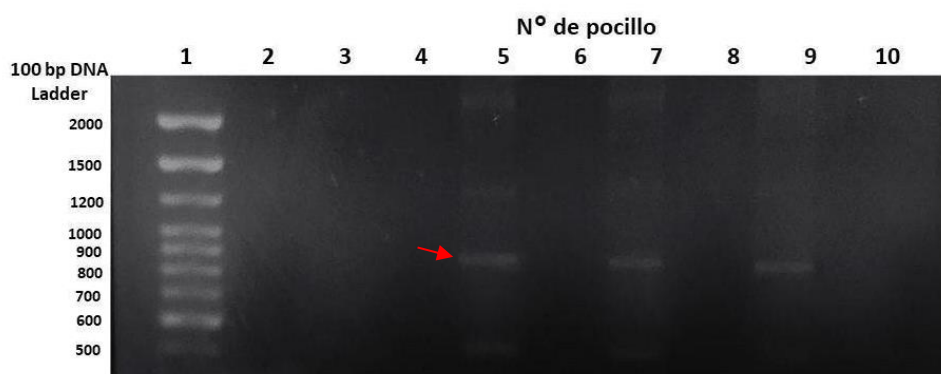
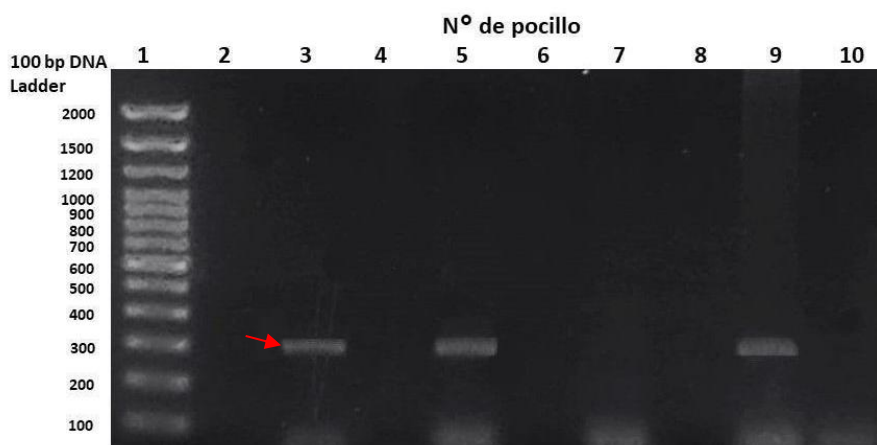


Figura 3. Detección molecular de *T. theileri* empleando los primers tipo catepsina. Productos de PCR empleando el set Tth F y DTTO R. La flecha roja muestra los productos esperados de amplificación. Carriles: 1, Marcador de 100 pb. 3, 5, 7 y 9, muestras de campo 4, 7, 9 y 12 respectivamente. 10, control sin templado.



Secuenciación y comparación con bases de datos

A partir de las secuenciaciones obtenidas de cada uno de los clones de cada set de primers, se obtuvieron un total de 7 contigs, 1 para la porción ITS denominada **LIMITS9C1**, 3 para la 18S denominados como **LM18S7C1** / **LM18S9C1** / **LM18S9C2**, y 3 para la región tipo catepsina, denominados como **LMCATL7C1** / **LMCATL12C1** / **LMCATL12C2**.

La secuencia consenso de la región ITS, denominada **LIMITS9C1**, presentó una longitud de 349pb y un G/C % de 39.8 %. Las secuencias consenso para la región 18S, identificadas como **LM18S7C1** / **LM18S9C1** / **LM18S9C2**, presentaron longitudes cercanas a 830 pb, junto con porcentajes de identidad que variaron entre el 100 y el 99.9%, y un promedio G/C % de 51.0 %. Por otra parte, las secuencias tipo catepsina, denominadas **LMCATL7C1** / **LMCATL12C1** / **LMCATL12C2**, presentan una longitud cercana a los 274 pb, junto con % de identidad entre el 99 y 91 % y G/C % promedio de 53.1 %.

Las secuencias de los diferentes clones obtenidos fueron sometidas a BLAST para comparar la estructura primaria de las regiones amplificadas con las secuencias de *T. theileri* presentes en la base de datos del NCBI, proveniente de diferentes hospedadores y partes del mundo. El BLAST de la secuencia **LIMITS9C1** muestra hasta un 97.7 % de identidad con otras

secuencias de *T. theileri* provenientes de Asia y Sudamérica, aisladas de hospedadores como bovinos y búfalos (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Comparación de identidad de la secuencia **LMITS9C1** con la base de datos del GenBank.

<i>Trypanosoma theileri</i> (LMITS9C1)	Número de acceso GenBank	Porcentaje de identidad	Localización	Especies de animales
<i>Trypanosoma theileri</i> (Suganuma et al. 2020)	LC546920	97.70	Filipinas	Diferentes especies
<i>Trypanosoma theileri</i> (Garcia et al. 2011)	HQ664824	93.49	Brasil	Bovinos y búfalos
<i>Trypanosoma theileri</i> (Jaimes et al. 2018)	MF142312	96.04	Colombia	Bovinos y búfalos
<i>Trypanosoma theileri</i> (Rodriguez et al. 2009)	GQ176150	95.38	Brasil	Bovinos

El BLAST de la secuencia **LM18S7C1** muestra hasta un 99.76 % de identidad con otras secuencias de *T. theileri* provenientes de Asia y América, aisladas de hospedadores como bovinos y búfalos; para la **LM18S9C1** muestra hasta un 99.40% de identidad con otras secuencias de *T. theileri* provenientes de Asia, África y Sudamérica, aisladas de hospedadores como ciervos y vectores tábanos; y para la secuencia **LM18S9C2** muestra hasta un 99.63 % de identidad con otras secuencias de *T. theileri* provenientes de Asia, África y Australia, aisladas de hospedadores como ciervos (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de identidad de secuencias clones 18S con la base de datos del GenBank.

<i>Trypanosoma theileri</i> (LM18S7C1)	Número de acceso GenBank	Porcentaje de identidad	Localización	Especies de animales
<i>Trypanosoma theileri</i> (Suganuma et al. 2018)	LC385952.1	99.76	Japón	Bovinos
<i>Trypanosoma theileri</i> (Fisher et al. 2013)	JX178182.1	99.64	Estados Unidos	Bovinos y búfalos

Identificación molecular de *Trypanosoma theileri* en bovinos de la parroquia de Limoncocha, Ecuador

<i>Trypanosoma theileri</i> (LM18S9C1)	Número de acceso GenBank	Porcentaje de identidad	Localización	Especies de animales
<i>Trypanosoma theileri</i> (Rosyadi et al. 2021)	LC618030.1	99.40	Japón	Ciervos
<i>Trypanosoma theileri</i> (Votypka et al. 2015)	KR024688.1	98.55	República central africana	Tábanos
<i>Trypanosoma theileri</i> (LM18S9C2)	Número de acceso GenBank	Porcentaje de identidad	Localización	Especies de animales
<i>Trypanosoma theileri</i> (Hatama et al. 2007)	AB569249.1	99.63	Japón	Ciervos
<i>Trypanosoma theileri</i> (Hamilton et al. 2009)	FM202489.1	99.37	Camerún	Ciervos

El BLAST de la secuencia **LMCATL7C1** muestra hasta un 100.0 % de identidad con otras secuencias de *T. theileri* provenientes de Asia y Sudamérica, aisladas de hospedadores como bovinos y vectores tábanos; para la **LMCATL12C1** muestra hasta un 94.85 % de identidad con otras secuencias de *T. theileri* provenientes de Asia, aisladas de hospedadores como búfalos y bovinos; y para la secuencia **LMCATL12C2** muestra hasta un 98.86 % de identidad con otras secuencias de *T. theileri* y 97.35 % con *Trypanosoma melophagium*, provenientes de Sudamérica, aisladas de hospedadores como bovinos, búfalos y ciervo (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de identidad de secuencias clones tipo catepsina con la base de datos del GenBank.

<i>Trypanosoma theileri</i> (LMCATL7C1)	Número de acceso GenBank	Porcentaje de identidad	Localización	Especies de animales
<i>Trypanosoma theileri</i> (Yokoyama et al. 2014)	AB930159.1	100.00	Sri Lanka	Bovinos
<i>Trypanosoma theileri</i> (Rodríguez et al. 2010)	GU299409.1	99.62	Brasil	Tábanos

<i>Trypanosoma theileri</i> (LMCATL12C1)	Número de acceso GenBank	Porcentaje de identidad	Localización	Especies de animales
<i>Trypanosoma theileri</i> (Garcia et al. 2010)	HQ543062.1	94.85	Tailandia	Bovinos
<i>Trypanosoma theileri</i> (Yokoyama et al. 2016)	LC125449.1	94.74	Vietnam	Búfalos
<i>Trypanosoma theileri</i> (LMCATL12C2)	Número de acceso GenBank	Porcentaje de identidad	Localización	Especies de animales
<i>Trypanosoma theileri</i> (Garcia et al. 2011)	HQ664745.1	98.86	Brasil	Bovinos y búfalos
<i>Trypanosoma melophagium</i> (Garcia et al. 2009)	MN756796.1	97.35	Brasil	Ciervos

Análisis filogenéticos

La figura 4. ilustra el árbol filogenético de *T. theileri* basado en la distancia con especies genéticamente similares, desde la más idéntica hasta la menos idéntica (datos generados mediante el BLAST).

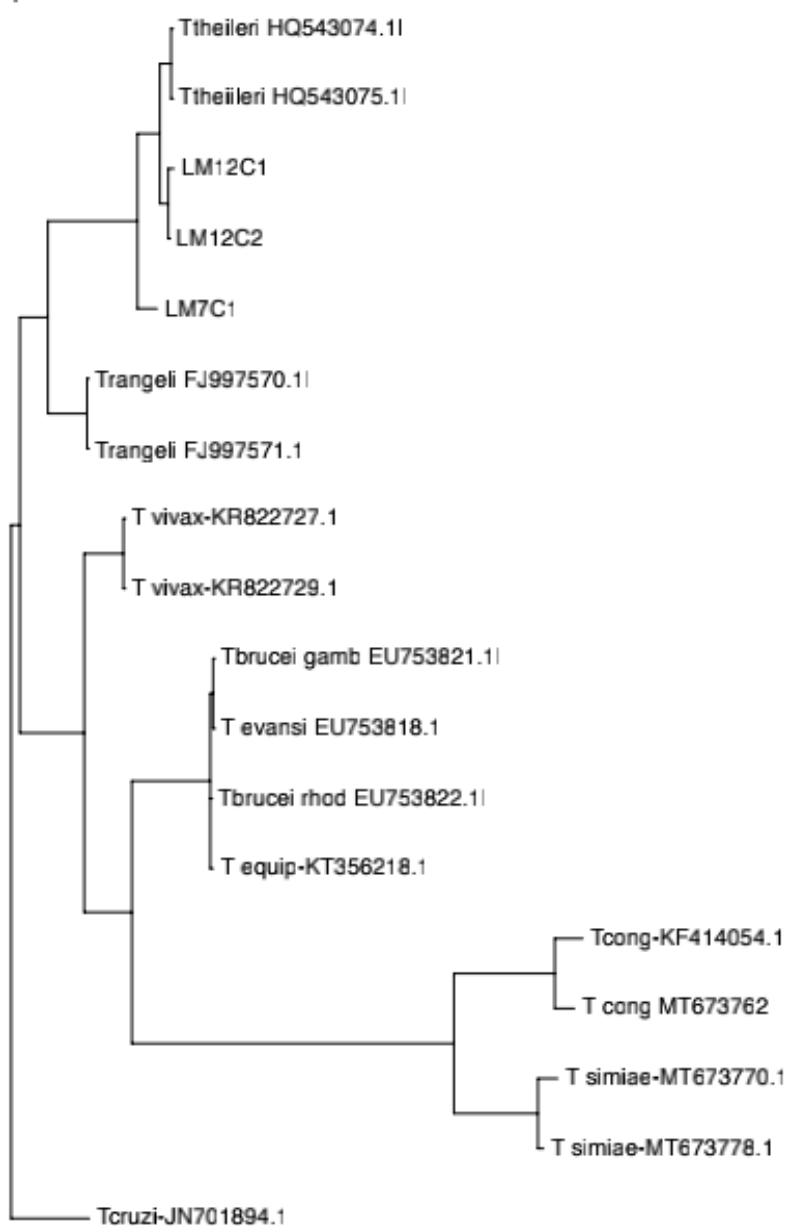
A partir de lo expuesto anteriormente, y mediante la utilización de las secuencias tipo catepsina, determinadas en el presente estudio, las 3 secuencias consenso LM12C1, LM12C2 y LM7C1 para *T. theileri*, se compararon con estudios definidos por el BLAST mostrando un porcentaje de similitud de alrededor del 96.32% con *T. theileri* HQ543074.1I y HQ543075.1I, estos hallazgos son consistentes con el análisis de datos de secuenciación descritos en las tablas 4,5 y 6, siendo estas las de más alto parentesco.

T. theileri presenta además una relación directa con la especie *T. rangeli*, sin embargo, se puede apreciar que con otras especies de tripanosomas como son *T. vivax*, *T. brucei*, *T. evasi* y *T. equiperdum* (las mismas que tienen alta similitud entre sí) forma clados mas lejanos; y con

respecto a *T. cruzi* se puede afirmar que su parentesco es más distante en comparación con los anteriormente mencionados, por lo cual *T. cruzi* está ubicado en la raíz del árbol.

Los resultados de los análisis filogenéticos usando el marcador de la región tipo catepsina sugieren que la especie detectada mediante pruebas moleculares es *T. theileri*.

Figura 4. Árbol filogenético basado en la región tipo catepsina.



Discusión

El clado de *T. theileri*, es un grupo de tripanosomas filogenéticamente relacionados, aislados de rumiantes y clasificados en el subgénero *T. (Megatrypanum)* (Rodrigues et al., 2006, 2010a,b), considerados parásitos complejos, segregados en dos linajes (TthI y TthII), que albergan 14 genotipos distintos, validados utilizando al menos dos marcadores moleculares diferentes, SSU e ITS rADN (Hamilton et al., 2009; Lee et al., 2010; Rodrigues et al., 2010a, b; Garcia et al., 2011a,b; Fisher et al., 2013).

Las infecciones por *T. theileri* del ganado son generalmente crónicas y asintomáticas y permanecen así durante años, ya que los parásitos rara vez se detectan en sangre periférica y suelen evadir las respuestas inmunitarias (Hoare, 1972; Wells, 1976). La especie *T. theileri* es considerado no patógena, aunque la infección por esta ha sido relacionada con patogenicidad en bovinos infectados concomitantemente con otros hemoparásitos o sometidos a estrés severo (Ward et al., 1984; Seifi, 1995; Braun et al., 2002; Villa et al., 2008)

En Ecuador, la extensa área geográfica utilizada para la crianza de animales y el intenso flujo interno de estos, favorecen el contacto y transmisión de *T. theileri*, lo que permite incrementar la diversidad genética de estos parásitos. Con este antecedente, la presencia de *T. theileri* en la parroquia de Limoncocha, provincia de Sucumbíos, fue determinada a través de PCR basados en los genes de ITS, 18S y tipo catepsina, lo que nos permitió identificar al parásito en esta población de bovinos.

La prevalencia de *T. theileri* encontrada en el presente estudio utilizando el primer ITS indica un 26.6 % de detección (4/15), y con los primers 18S y tipo catepsina se logró generar un 20 % de detección (3/15). Este estudio de prevalencia y detección de *T. theileri* constituye

hasta la fecha y de acuerdo a nuestra revisión bibliográfica, el primer estudio molecular en la detección de esta especie en el territorio ecuatoriano.

Otros trabajos, como el de Medina-Naranjo et al (2017), en la provincia de Pastaza – Ecuador, determinó una seroprevalencia mediante ELISAI del 31.03% (18/58) positivos a anticuerpos anti *Trypanosoma spp* en la zona. En el estudio de Hinojosa (2021), se determinó una seroprevalencia general de anticuerpos anti *Trypanosoma spp.* mediante ELISAI del 16.82% (n = 18/107), este estudio fue realizado en las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos. Estos trabajos sugieren la presencia de tripanosomátidos asociados a las especies *T. evansi* y *T. vivax*, por lo cual la región del oriente ecuatoriano presenta una gran variedad de este género de hemoparásitos circulando en el ganado bovino.

Debido a que Ecuador es una zona de alta actividad ganadera concentrada en las regiones costa y oriente, la presencia de *T. theileri* en esta población puede aumentar en animales inmunodeprimidos, desencadenando patogenicidad en el huésped infectado pudiendo provocar anemia, abortos y la muerte, con parásitos que se dispersan por varios órganos, incluso al SNC (Ward et al., 1984; Seifi, 1995; Braun et al., 2002; Villa et al., 2008). De igual forma, en cuanto a estudios moleculares, el estudio de Chávez-Larrea et al. (2020) realizado en la provincia de Manabí determinó que el 15% (3/20) de la población de estudio fue positiva para *T. vivax* mediante la utilización de primers tipo catepsina.

Cassalett et al (2011), manifiesta en su estudio que las secuencias de genes de ADN ribosomal (rDNA) o de sus constituyentes en copias múltiples, da la posibilidad de abordar bajo pruebas moleculares los valores de sensibilidad y especificidad (Prichard y Tait, 2001; Delespaulx et al., 2003; Geysen et al., 2003; Malele et al., 2003; Tamasaukas et al., 2010). Además, investigaciones llevadas a cabo por Desquesnes et al. (2001), quienes a través de la técnica de PCR utilizaron los espacios internos de transcripción (ITS) del rDNA, amplificando

el ITS1 situada entre los genes rRNA 18S y 5.8S, mostraron diferencias entre especies, con cierta disminución en la detección, cuando se presentaban infecciones combinadas de varias especies de tripanosomas, siendo una herramienta potencial para el diagnóstico especie-específico. Geysen et al. (2003), implementaron la utilización de secuencias conservadas específicas del gen 18S de la Ssu rDNA del *Trypanosoma*, demostrando que es un método altamente específico ante infecciones cruzadas con cepas de *T. vivax*, *T. brucei*, *T. congolense*, *T. theileri* y *T. simiae*.

La diversidad filogenética de *T. theileri* es más efectivamente evidenciada cuando se usa marcadores polimorficos tales como ITS, SL o CATL. Los tradicionales gGAPDH y SSU rDNA son más conservados y no evidencian todos los genotipos de *T. theileri* (Pacheco et al. 2018). En el estudio realizado en Colombia por Jaimez-Dueñez et al. (2018) en el cual se utilizaron primers de la pequeña unidad ribosomal (18S) y tipo catepsina determinaron por análisis molecular en bovinos una prevalencia de 39.2% de *Trypanosomas spp.* (*T. theileri* 38.6%, *T. evansi* 6.7% y *T. vivax* 0.2%); mientras que en búfalos la prevalencia fue de 28.2% (*T. theileri* 28.2% y *T. evansi* 1.3%). Un nuevo estudio realizado en Colombia en 2020 por Jaime-Dueñez et al. en 39 muestras de sangre de murciélagos usando marcadores genéticos SSU rDNA, ITS rDNA, y CATL, determinaron por PCR 66.7% (26/39) *Trypanosomas spp.*; de las cuales 61.5% (24/39) fueron identificadas como *T. theileri* y 5.1% (2/39) como *T. wauwau-like*. Mientras que en Brasil, Pacheco et al. (2018) determino 39 (12.19%) muestras positivas de 329 bovinos para *T. theileri* mediante PCR-TthCATL.

La detección molecular de *T. theileri* en el presente trabajo fue confirmada mediante la clonación y secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR. Como se pudo evidenciar mediante el BLAST, se muestran elevados porcentajes de identidad para la especie de *T. theileri*, con secuencias presentes en la base de datos del GenBank pertenecientes tanto a

Sudamérica y Asia, de diferentes hospedadores, principalmente bovinos y búfalos. Se hace necesario llevar a cabo análisis filogenéticos más detallados y robustos con la finalidad de establecer con mayor claridad las relaciones genéticas entre los parásitos circulantes en Ecuador con los presentes en Sudamérica y el resto del mundo. De igual manera, es importante realizar investigaciones para establecer las potenciales cadenas de transmisión y aclarar el rol de los vectores, como tábanos y garrapatas en la transmisión del parásito, por lo cual, es recomendable llevar a cabo estudios moleculares en vectores potenciales.

Conclusiones

Este estudio representa el primer reporte de *T. theileri* detectado por PCR y confirmado mediante la secuenciación de diferentes marcadores que son ITS, 18S y CATL, en Ecuador. El uso de este conjunto de primers constituye un elemento apropiado para los estudios epidemiológicos de la tripanosomosis causada por *T. theileri* en animales naturalmente infectados. La presencia de *T. theileri* indica un riesgo importante para bovinos que tengan comprometido su sistema inmunológico, con enfermedades concomitantes, así como también para sus crías y el ganado en etapa de gestación. La detección del *T. theileri* por PCR en animales sin diagnóstico ni sintomatología permitió establecer la presencia de animales positivos, independientemente de los niveles de parasitemia que tenían. La depresión del sistema inmune permite un aumento de la parasitemia. La identificación del parásito en los bovinos de la parroquia de Limoncocha sugiere la presencia de portadores asintomáticos del parásito, generando una problemática difícil de resolver mediante la implementación exclusiva en campo de pruebas parasitológicas clásicas. De acuerdo con los resultados obtenidos, puede darse una situación biológica, donde no se detecta la presencia del parásito con diagnóstico

parasitológico directo, pero son positivos mediante pruebas moleculares como la PCR. Por tanto, es necesario realizar estudios epidemiológicos para un diagnóstico sensible y específico de tripanosomosis por *T. theileri*, cuyo propósito sea tomar las medidas sanitarias adecuadas para el control de la enfermedad y evitar pérdidas económicas en el campo ganadero. Con los resultados obtenidos en este trabajo, Limoncocha se puede considerar una zona donde prevalecen la especie de tripanosoma *T. theileri*, debido a las muestras que resultaron positivas a este parásito por medio de la PCR. La diferenciación entre especies de *Trypanosoma* por PCR, permitirá un mejor manejo epidemiológico de la enfermedad en esta zona, dado que la diferenciación entre especies determinará las medidas de prevención y control a emplear, para lo cual se recomienda realizar investigaciones en poblaciones cercanas a las del estudio, determinar cuáles son los vectores involucrados en la transmisión, el impacto y los riesgos que representa la presencia del parásito en dichas poblaciones, como afectan las vías de producción ganadera, y su prevalencia en otras regiones donde el clima facilite la diseminación de este parásito.

Bibliografía

- A.A. Latif M.A. Bakheit Amna E. Mohamed E. Zweygarth (2004). High infection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. *Journal of Veterinary Research*, 71(4). <https://hdl.handle.net/10520/EJC86189>
- Amato, B., Mira, F., Di Marco Lo Presti, V., Guercio, A., Russotto, L., Gucciardi, F., Vitale, M., Lena, A., Loria, G. R., Puleio, R., & Cannella, V. (2019). A case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma theileri* in Sicily, Italy. *Parasitology Research*, 118(9), 2723–2727. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06390-y>
- Baticados, W., Baticados, A., & Fernandez, C. P. (2010). Parasitological examination for *Trypanosoma theileri* infection of cattle from Quirino Province, Philippines. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 3. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s16169>

- Braun, U., Rogg, E., Walser, M., Nehrbass, D., Guscetti, F., Mathis, A., Deplazes, P., 2002. *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of heifer with suppurative meningoencephalitis. *Vet. Rec.* 150, 18–19
- Calzolari, M., Rugna, G., Clementi, E., Carra, E., Pinna, M., Bergamini, F., Fabbi, M., Dottori, M., Sacchi, L., & Votýpka, J. (2018). Isolation of a trypanosome related to *trypanosoma theileri* (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfiliewi* (Diptera: Psychodidae). *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2597074>
- Cassalett B., E. R., V., V. J., Parra A., J. L., & Baldrich F., R. M. (2010). Diagnóstico y caracterización molecular de infecciones naturales por *Trypanosoma* spp. en bovinos de la Orinoquía Colombiana. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12(1), 86. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num1_art:218
- Chávez-Larrea, M. A., Medina-Pozo, M. L., Cholota-Iza, C. E., Jumbo-Moreira, J. R., Saegerman, C., Proaño-Pérez, F., Ron-Román, J., & Reyna-Bello, A. (2021). First report and molecular identification of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 2422–2428. <https://doi.org/10.1111/tbed.13906>
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>
- Delespaulx V, Ayral F, Geysen D, Geerts S. 2003. PCR-RFLP using *Ssu*-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. *Vet Parasitol* 117:185-193. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.08.004>
- Desquesnes M, Dávila AMR. 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes; a review and perspectives. *Vet Parasitol* 109:213-231. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00270-4)
- Fisher AC, Schuster G, Cobb WJ, James AM, Cooper SM, Pérez de León AA, et al. Molecular characterization of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) spp. infecting cattle (*Bos taurus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and elk (*Cervus elaphus canadensis*) in the United States. *Vet Parasitol* 2013; 197(1-2): 29-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.037>. PMID:23683651.

- Garcia, H. A., Kamyngkird, K., Rodrigues, A. C., Jittapalapong, S., Teixeira, M. M. G., & Desquesnes, M. (2011). High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Veterinary Parasitology*, 180(3–4), 363–367. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.017>
- García H, Rangel-Rivas A, Contreras I, García ME, García F, Perrone T. 2009. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela. *Rev Cient* 19(3): 230-237.
- Geysen D, Delespaulx V, Geerts S. 2003. PCR-RFLP using *Ssu*-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet Parasitol* 110: 171-180. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00313-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00313-8)
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol* 2004; 34(12): 1393-1404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.08.011>. PMID:15542100.
- Hinojosa, D. (2021). DETERMINACIÓN DE LA SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA CAUSADA POR *Trypanosoma* spp. EN TRES PROVINCIAS DEL ORIENTE ECUATORIANO (NAPO, ORELLANA, SUCUMBÍOS). UISEK, 1–36.
- Hoare, C. A. (1964). Morphological and taxonomic studies of. *South African Journal Of Botany*, 11(2), 200–207. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1964.tb01741.x>
- Jaimes-Dueñez, J., Cantillo-Barraza, O., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2020). Molecular surveillance reveals bats from eastern Colombia infected with *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma wauwau*-like parasites. *Preventive Veterinary Medicine*, 184(52). <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105159>
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 249(52), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004>
- Lee YF, Cheng CC, Lin NN, Liu SA, Tung KC, Chiu YT. Isolation of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* from dairy cattle in Taiwan. *J Vet Med*

- Sci 2010; 72(4): 417-424. <http://dx.doi.org/10.1292/jvms.09-0343>. PMID:20009352.
- Malele I, Craske L, Knight C, Ferris V, Njiru Z, Hamilton P, Lehane S, Lehane M, Gibson W. 2003. The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. *Infect Genet Evol* 3(4):271-279. [https://doi.org/10.1016/s1567-1348\(03\)00090-x](https://doi.org/10.1016/s1567-1348(03)00090-x)
- Medina-Naranjo, V. L., Reyna-Bello, A., Tavare-Marques, L., Campos, A. M., Ron-Román, J. W., Moyano, J. C., Chávez-Larrea, M. A. (2017). Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp, mediante las técnicas de ELISAi y PCR en tres fincas ganaderas en la provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista científica*, vol. XXVII, núm. 3, 162-171.
- Ortega-Montalvo, H. R.-R.-B.-L. (2014). First report and molecular identification of *Trypanosoma vivax* in cattle from Ecuador. *13th International Congress of Parasitology*, 10.15.
- 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. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>
- Pacheco, T. D. A., Marcili, A., da Costa, A. P., Witter, R., Melo, A. L. T., Boas, R. V., Chitarra, C. S., Dutra, V., Nakazato, L., & Pacheco, R. de C. (2018). Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 27(4), 579–583. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180049>
- Prichard R, Tait A. 2001. The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 98:169-194. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00429-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00429-0)
- Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Ortiz, P. A., Cortez, A. P., Martinkovic, F., Paiva, F., Batista, J. S., Minervino, A. H., Campaner, M., Pral, E. M., Alfieri, S. C., & Teixeira, M. M. G. (2010a). Cysteine proteases of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri*: Cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*, 59(3), 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.002>
- Rodrigues AC, Garcia HA, Batista JS, Minervino AH, Goés-Cavalcante G, Maia da Silva F, et al. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of

- genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology* 2010b; 137(1): 111-122. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009991053>. PMID:19765336.
- Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MMG. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 2006; 132(Pt 2): 215-224. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182005008929>. PMID:16197590.
- Rodríguez Gómez, H. (1964). Contribución al estudio de la Tripanosomiasis Bovina, por medio de la fijación de complemento. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 27(127), 1121–1191.
- Schuster, J. P., Ènter, G., & Schaub, A. (2000). *Trypanosoma cruzi*: skin-penetration kinetics of vector-derived metacyclic trypomastigotes. *International Journal for Parasitology*, 30, 1475–1479. Retrieved from www.parasitology-online.com
- Suganuma, K., Kondoh, D., Sivakumar, T., Mizushima, D., Elata, A. T. M., Thekiso, O. M. M., Yokoyama, N., & Inoue, N. (2019). Molecular characterization of a new *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. *Parasitology Research*, 118(6), 1927–1935. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06313-x>
- Tamasaukas R, Agudo-Castellanos L, Silva-Ravelo A, Florio-Luis J, Vintimilla-Tamasaukas M, Ribera-Pirela S. 2010. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito Venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Agron Mesoam* 21(2):367-381.
- Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacón, G., Sanz, P. V., Büscher, P., & Touratier, L. (2008). Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149, 352–354. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.016>
- Votýpka, J., d'Avila-Levy, C. M., Grellier, P., Maslov, D. A., Lukeš, J., & Yurchenko, V. (2015). New Approaches to Systematics of Trypanosomatidae: Criteria for Taxonomic (Re)description. *Trends in Parasitology*, 31(10), 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.06.015>
- Ward, W.H., Hill, M.W., Mazlin, I.D., Foster, C.K., 1984. Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. *Vet. J.* 61, 324.
- Wells, E.A., 1976. Subgenus *Megatrypanum*. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London, pp. 257–275.

Yokoyama, N., Sivakumar, T., Fukushi, S., Tattiyapong, M., Tuvshintulga, B., Kothalawala, H., Silva, S. S. P., Igarashi, I., & Inoue, N. (2015). Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 207(3–4), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.006>