



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



**UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY**

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE
TRIPANOSOMOSIS EN URUGUAY**

Evaluación serológica de la tripanosomosis en bovinos y equinos

Fabiana Gisel López Caetano

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2024



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE TECNICAS DE DIAGNOSTICO DE
TRIPANOSOMOSIS EN URUGUAY**

Evaluación serológica de la tripanosomosis en bovinos y equinos

Fabiana Gisel López Caetano

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

PhD Gonzalo Greif

Director de Tesis

2024

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Presidente: Andrés Cabrera; Lic. en Ciencias Biológicas, MSc, PhD

Laboratorio de Interacciones Hospedero- Patógeno

Institut Pasteur de Montevideo

Unidad Académica de Parasitología y Micología

Facultad de Medicina

Universidad de la República, Uruguay

Iván A. Bontempi; Lic. en Biotecnología, PhD

Laboratorio de Tecnología Inmunológica

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe- Argentina

José M. Venzal; DMTV, MSc, PhD

Laboratorio de Vectores y Enfermedades transmitidas

Departamento de Ciencias Biológicas- Centro Universitario Regional Litoral Norte

Universidad de la República, Uruguay

ACTA DE DEFENSA DE TESIS



Centro de Posgrados y Educación Permanente
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República

ACTA DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

ORIENTACIÓN: MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 17/12/2024 Híbrido - CENUR Tacuarembó (salón 5).

TRIBUNAL: Dr. Andres Cabrera (Presidente) Dr. Ivan Bontempi Dr. José Manuel Venzal

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3991792-7	Fabiana Gisel López Caetano	S.S.S.	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

FIRMA

Dr. Andrés Cabrera

Dr. Ivan Bontempi

Dr. José Manuel Venzal

INFORME DEL TRIBUNAL

Tacuarembó, 17 de diciembre de 2024.

En el día de la fecha, se lleva a cabo la defensa de la tesis de maestría del programa de Posgrado en Salud Animal titulada “DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE TRIPANOSOMOSIS EN URUGUAY”, presentada por Fabiana Gisela López Caetano. Tanto la versión escrita como la presentación oral evidencian un profundo conocimiento del tema, así como un enfoque experimental destacado, alineado con los objetivos propuestos en la tesis.

Esta investigación contribuye al desarrollo de una nueva herramienta serológica para el diagnóstico preciso de la tripanosomosis bovina y equina, que podría tener un gran impacto en la producción nacional en el futuro. Además, aporta valiosos datos epidemiológicos sobre la enfermedad, los cuales fortalecerán el diagnóstico, manejo y prevención de la tripanosomosis en el país.

En virtud de lo expuesto, este tribunal decide, por unanimidad, otorgar a esta tesis la calificación de Aprobado con nota 12.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor Gonzalo Greif por la paciencia infinita, por transmitirme su conocimiento y su pasión por el tema. A Cecilia Miraballes por apoyarme e incentivarme a iniciar este camino.

A mis compañeros, Blanca, Luis, Fabiana, Cris y Sabri, sin ellos esto hubiera sido imposible.

A DILAVE, a la Facultad de Veterinaria, y al IPM, por recibirme y permitirme cumplir con este trabajo. A los colegas que remitieron las muestras.

A INIA por financiar parte del proyecto, y en especial a los funcionarios de INIA La Magnolia, por ayudarme en la etapa de inmunización experimental.

A Marc Desquesnes del Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), por compartir su enorme conocimiento con nosotros y cedernos antígeno para las pruebas.

A Iván Bontempi (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Argentina), Camila Belmonte Oliveira (Departamento de Microbiología e Parasitología del Instituto de Biología de UFPelotas, Brasil), Ulises Cuore y Diana Martínez (Departamento de Parasitología, DILAVE Central), por facilitarnos muestras desinteresadamente. A Martina Crispo del IPM por su ayuda en la redacción del protocolo de inmunización.

A mi familia “grande”, mamá, papá, hermanas y sobris, y a mis amigos, por acompañarme en este camino. A Graciela, siempre presente en mi corazón.

Por último, pero mis agradecimientos más profundos, a Fede por su amor y su apoyo en los momentos más difíciles, a mis hijos Mau y Alfo, que aguantaron con mucha entereza mis ausencias en este proceso, y a mi ángel amada Emi, tu luz me guiará y cuidará siempre. Mis logros son suyos.

INDICE

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Etiología	3
1.2. Ciclos de vida de los tripanosomas	5
1.3. Transmisión mecánica	7
1.4. Signos clínicos y lesiones postmortem	9
1.5. Tratamiento y control	11
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	12
2.1. Situación regional	12
2.1.1. <i>Trypanosoma vivax</i>	12
2.1.2. <i>Trypanosoma evansi</i>	14
2.1.3. <i>T. evansi</i> en animales silvestres	14
2.2. Situación en Uruguay	15
2.3. Diagnóstico de laboratorio	16
2.3.1. Detección directa	16
2.3.1.1. Microscopía	16
2.3.1.2. Técnicas de detección de ADN	17
2.3.2. Detección indirecta	18
2.3.2.1. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)	19
3. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	22
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo general	24
4.2. Objetivos específicos	24
5. ESTRATEGIA DE INVESTIGACIÓN	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Ensayo de inoculación	27
6.2. Antígenos utilizados	28
6.3. Desarrollo de un ELISA indirecto para detección de anticuerpos contra <i>T. vivax</i>	28
6.4. Determinación de parámetros de ensayo iELISA- <i>T. vivax</i>	29

6.5. Obtención de muestras y procesamiento por iELISA- <i>T. vivax</i>	29
6.6. Selección de sueros para procesar por iELISA- <i>T. vivax</i> y iELISA- <i>T. evansi</i>	30
6.7. Análisis estadístico	31
7. RESULTADOS	32
7.1. Ensayo de inmunización para obtención de anticuerpos policlonales de origen bovino, y desarrollo y puesta a punto de un protocolo de elisa indirecto.....	32
7.2. Determinación de parámetros de ensayo iELISA- <i>T. vivax</i>	35
7.3. Procesamiento de muestras de suero de bovinos y equinos por iELISA- <i>T. vivax</i>	37
7.3.1. Seroprevalencia para ensayo iELISA- <i>T. vivax</i> según motivo de consulta	37
7.3.2. Seroprevalencia para ensayo iELISA- <i>T. vivax</i> según departamento.....	39
7.4. Puesta a punto de iELISA- <i>T. evansi</i> y comparación con iELISA- <i>T. vivax</i>	41
7.4.1. Sueros controles.....	42
7.4.2. Resultados de muestras de bovinos y equinos.....	43
8. DISCUSION	47
9. CONCLUSIONES.....	53
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54
ANEXOS	69
ANEXO I. PROTOCOLO DE INOCULACIÓN EXPERIMENTAL	69
ANEXO II. PROTOCOLO CEUA.....	71
ANEXO III. PROTOCOLO DE ELISA INDIRECTO ESTANDARIZADO	72
ANEXO IV. SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN iELISA	73

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de *Trypanosoma vivax*. Extraído de Desquesnes et al. 2022a.

Figura 2. Distribución geográfica de *Trypanosoma evansi* (“surra”). Extraído de Desquesnes et al. 2022a.

Figura 3. Taxonomía del género *Trypanosoma*. Extraído con modificaciones de Desquesnes 2004 de acuerdo a criterios de OMS en 1991.

Figura 4. Imagen microscópica de los principales tripanosomas de mamíferos en frotis de sangre fina teñidos con Giemsa. (Fuente: Desquesnes et al. 2022a)

Figura 5. Diagrama de diferentes formas de tripanosomatidos. (Fuente: Greif 2015).

Figura 6. Variación del ciclo de vida entre los tripanosomas africanos. Extraído de Jackson et al. 2015.

Figura 7. Diagramas de los ensayos de ELISA más utilizados: Extraído de “Guía y Protocolos de ELISA” (Thermo Scientific Guide)

Figura 8. Línea de tiempo con las distintas instancias en el ensayo de inmunización.

Figura 9. Foto de placa de ensayo de ELISA de sueros de la vaca inmunizada experimentalmente.

Figura 10. Densidad óptica (DO) promedio de duplicados para las 14 muestras obtenidas en el ensayo de inmunización.

Figura 11. Boxplot mostrando valores de DO e IDON por categoría de los sueros positivos y de los sueros negativos.

Figura 12. Boxplot de valores de IDON correspondientes a sueros bovinos.

Figura 13 Seroprevalencia general según motivo de consulta.

Figura 14. Se representa la seroprevalencia por departamento discriminada para bovinos y equinos.

Figura 15. Valores de DO de los sueros utilizados como control negativo (suero preinmune) y controles positivos (de vaca inmunizada del día 13/7 y 20/7) en los dos sistemas evaluados.

Figura 16. Boxplot representando el IDON según especie en los dos sistemas: iELISA- *T. vivax* (TV) y iELISA- *T. evansi* (TE).

Figura 17 Gráfico de dispersión mostrando la relación entre IDON en iELISA-TV e IDON iELISA-TE para bovinos y equinos.

Cuadro I. Valores de Densidad óptica (DO) promedio de las muestras extraídas según días posteriores a la primera inoculación.

Cuadro II. Tabla de contingencia, fórmulas utilizadas para calcular los parámetros de la prueba.

Cuadro III. Cantidad de muestras procesadas de bovinos y equinos según motivo de consulta.

Cuadro IV. Sueros analizados de bovinos discriminados por departamento

Cuadro V. Sueros analizados de equinos discriminados por departamento.

Cuadro VI. Resultados de DO promedio obtenidos para los sueros controles (suero preinmune por triplicado, dos sueros positivos por duplicado) para las 2 placas realizadas.

Cuadro VII. DO promedio e IDON de las muestras seleccionadas de bovinos y equinos para cada sistema de ELISA.

RESUMEN

La tripanosomosis es un conjunto de enfermedades de humanos y animales causadas por parásitos de la familia Trypanosomatidae. En Latinoamérica particularmente *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi* ocasionan gran impacto económico en animales de producción. Ambos parásitos pueden afectar distintas especies de mamíferos provocando infecciones que van desde asintomáticas a leves, cuadros anemizantes, signos nerviosos y reproductivos, hasta altas tasas de mortalidad. En Uruguay no existen reportes de casos de tripanosomosis en especies de producción siendo numerosos los reportes en países vecinos. Este estudio tuvo como objetivo desarrollar una técnica de diagnóstico serológico para determinar la seroprevalencia de esta parasitosis en el país. Para el estudio se seleccionaron y procesaron 681 muestras (103 de equinos y 578 de bovinos) de departamentos del norte del país remitidas al Laboratorio DILAVE-MGAP Tacuarembó con distintos motivos de análisis (vigilancia en faena, exportación, diagnóstico de casos con síntomas compatibles). La seroprevalencia de *Trypanosoma* spp. encontrada fue de 42% en equinos y 32% en bovinos. Estos resultados demuestran, por primera vez, la presencia de anticuerpos contra parásitos de la familia Trypanosomatidae en animales de producción con patologías concomitantes y de animales clínicamente sanos en el Uruguay. Se necesitan más estudios para confirmar los géneros y especies presentes, así como la importancia económica y clínica en los rodeos nacionales.

SUMMARY

Trypanosomosis is a group of human and animal diseases caused by parasites of the family Trypanosomatidae. In Latin America, particularly *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma evansi* cause great economic impact in production animals. Both parasites can affect different species of mammals causing infections ranging from asymptomatic or mild cases to anemia, nervous and reproductive signs, to high mortality rates. In Uruguay, there are no reports of cases of trypanosomosis in production species, although there are numerous reports in neighboring countries. The aim of this study was to develop a serological diagnostic technique to determine the seroprevalence of this parasitosis in the country. For the study, 681 samples were selected and processed (103 equine and 578 bovine) from departments from the northern, western, and central regions of the country sent to the DILAVE-MGAP Tacuarembó Laboratory with different reasons for analysis (surveillance at slaughter, export, diagnosis of cases with compatible symptoms). The seroprevalence of *Trypanosoma* spp. found was 42% in horses and 32% in cattle. These results demonstrate, for the first time, the presence of antibodies against parasites of the family Trypanosomatidae in livestock animals with concomitant pathologies and clinically healthy animals in Uruguay. Further studies are needed to confirm the genera and species present, as well as the economic and clinical importance of the parasites in livestock animals.

1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por agentes de la familia Trypanosomatidae afectan tanto a humanos como a animales. En los humanos se destacan la leishmaniasis producida por *Leishmania* spp., la enfermedad del sueño producida por *Trypanosoma brucei* (especialmente subespecies *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*) y la enfermedad de Chagas o tripanosomosis americana producida por *Trypanosoma cruzi* (Salvatella 2016, Buscher et al. 2017). En los animales, se destacan la Nagana y Surra que son parte de las Tripanosomosis Animales de Origen Africano (ATAO por Animal Tripanosomosis African Origin) (Auty et al. 2015, Desquesnes et al 2022a).

Nagana, término africano que puede traducirse como “espíritu deprimido” (de Kruijff, 1950), es causada por *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. brucei brucei* y *T. simiae* (Wells 1972, Constable 2017). Su distribución en África tradicionalmente estuvo relacionada con las moscas del género *Glossina* sp. (conocidas como moscas tse-tsé) que actúan como vector biológico (transmisión biológica) (Gardiner y Wilson, 1987), extendiéndose luego a otras áreas libres de estas moscas y adaptándose a otros medios de transmisión (figura 1). En Latinoamérica *T. vivax* es el responsable de la tripanosomosis en ganado bovino siendo identificado por primera vez en la Guyana Francesa por Larger y Vienne en 1919 (Wells 1984; Gardiner y Wilson, 1987). Probablemente se introdujo a este continente, a fines del siglo XV durante la colonización y el ingreso de animales siguiendo la ruta de los esclavos africanos (García et al. 2014) o en años posteriores con animales traídos de África a las islas del Caribe y Guyana Francesa (Osório et al. 2008). En Colombia y Venezuela se considera a la tripanosomosis por *T. vivax* una enfermedad frecuente (Wells 1984, Silva et al. 2002). Las cepas americanas derivan de África Occidental, aunque se han encontrado algunas diferencias en cuanto a la diversidad de antígenos de superficie, la habilidad de infectar moscas tse-tsé y capacidad de crecer in vitro, así como en su composición genómica (Jones y Dávila 2001, García et al. 2014, Greif 2015).

Por otra parte, Surra (“podrido” en hindú), también es conocida como Derrengadera (Venezuela), Murrina (Panamá) y Mal de Caderas (Brasil y otros países sudamericanos) (Desquesnes et al. 2013, OMSA 2021b). El agente causal es *Trypanosoma evansi* (Steel 1885, Balbiani 1888), el primer tripanosoma patógeno descrito en mamíferos por Griffith Evans en 1880 en la sangre de equinos y dromedarios de India (Aregawi et al. 2019). Los animales susceptibles a Surra incluyen camellos, equinos, búfalos, bovinos, suinos y cánidos

(OMSA 2021b). En sus orígenes *T. evansi* se distribuía en conjunto con el camello, pero actualmente su distribución es mucho más amplia (Aregawi et al. 2019) (figura 2). En Europa, ocurrieron brotes de Surra tras la importación de dromedarios infectados, pero fueron resueltos rápidamente (Desquesnes et al. 2013, Aregawi et al. 2019). En el continente americano, *T. evansi* pudo haber sido introducido también durante la colonización española con los caballos árabes (Desquesnes et al. 2013). *T. evansi* se parece a las formas esbeltas de *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*. La mayor parte de las caracterizaciones indican que distintas cepas de *T. evansi* aisladas en Asia, África y Sudamérica son muy homogéneas y podrían tener un origen común (Ventura et al. 2001) pudiendo ser subespecies de *T. brucei* (Lai et al. 2008). Aunque se describen otros tripanosomas afectando a equinos como *T. equiperdum* y *T. cruzi* (Brun et al. 1998, Bryan et al. 2016, Gisaw et al. 2017), nos enfocaremos en *T. evansi* notificado en Uruguay en 2018 en perros y 2020 en equinos (OMSA 2023).

Las tripanosomosis causan pérdidas económicas directas e indirectas en la ganadería. Las pérdidas directas incluyen disminución de la condición corporal, problemas reproductivos y alta mortalidad en animales no tratados. Las pérdidas indirectas se relacionan con los costos de control de vectores, tratamientos y prevención de enfermedades en animales susceptibles (Kristjanson et al. 1999, CFSPH 2018). En África, se estima que las pérdidas por Nagana ascienden a 3 millones de dólares anuales, con 35 millones de dosis de tratamientos utilizadas al año (Shaw et al. 2014, Angara et al. 2014).

La importancia de estas enfermedades radica en su impacto en la salud de los animales, así como en las pérdidas económicas que generan. Es fundamental implementar medidas de control y prevención para reducir la incidencia de tripanosomosis en la ganadería.

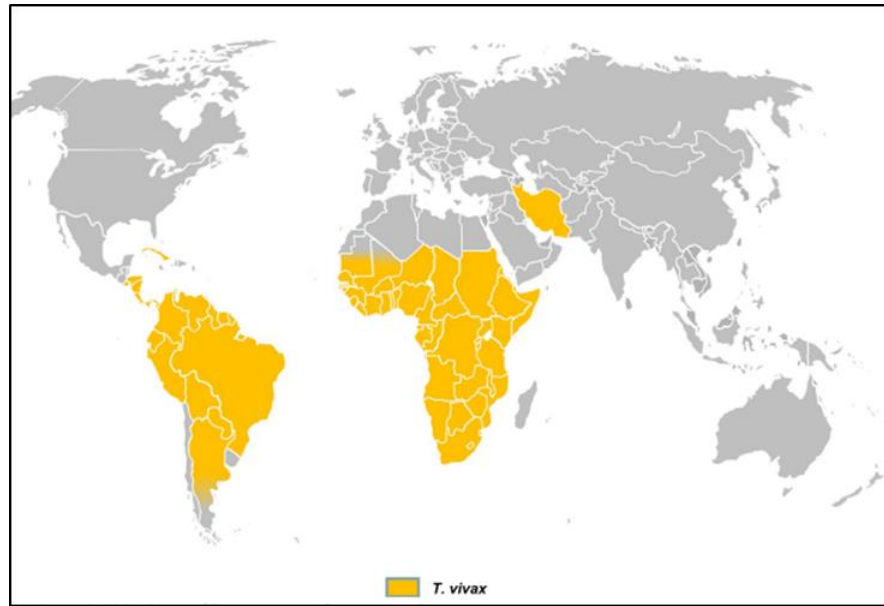


Figura 1. Distribución geográfica de *Trypanosoma vivax*. En amarillo se muestran los países que han reportado la presencia de *T. vivax*. Extraído de Desquesnes et al. 2022a.

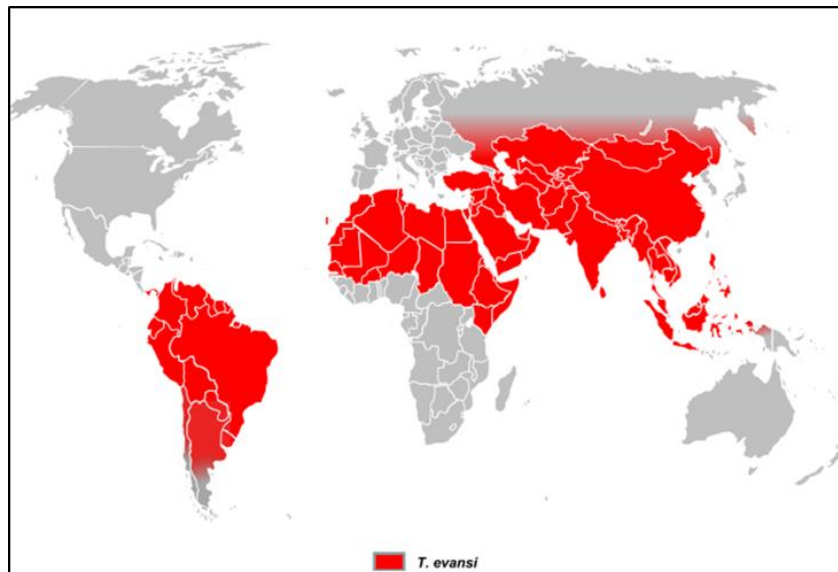


Figura 2. Distribución geográfica de *Trypanosoma evansi* (“surra”). En rojo se muestran los países que han reportado la presencia de *T. evansi*. Extraído de Desquesnes et al. 2022a. Nótese la mayor distribución de *T. evansi* en comparación con el anterior. Uruguay

1.1 ETIOLOGÍA

Las tripanosomosis son enfermedades causadas por protozoarios parásitos que pertenecen a la familia Trypanosomatidae (Doflein, 1901, emend. Grobben 1905), orden Kinetoplastida (Honigberg, 1963), clase Zoomastigophorea (Calkins, 1909) (Figura 3). Comprenden organismos flagelados unicelulares con una mitocondria especial llamada

kinetoplasto. Tienen forma lanceolada o de hoja, aunque también pueden existir formas redondeadas que incluyen algunos géneros de la familia y algunas formas dentro del ciclo biológico de algunas especies (Soulsby 1987, Desquesnes 2004, Greif 2015, Constable 2017).

Estos parásitos se clasifican en dos grupos principales, "Salivaria" y "Stercoraria", según su modo de transmisión biológica. El grupo "Salivaria" incluye parásitos que se desarrollan en la parte anterior o media del tracto digestivo del vector biológico e inoculan las formas metacíclicas al hospedero vertebrado a través de la saliva. Mientras que el grupo "Stercoraria" está integrado por parásitos que se desarrollan en la parte posterior del tracto digestivo del insecto transmitiéndose por medio de las heces. El *T. cruzi*, agente causante de la enfermedad de Chagas, pertenece al grupo "Stercoraria" (Desquesnes 2004, Desquesnes et al. 2013).

En la Figura 3 se observan los distintos niveles taxonómicos, del Género *Trypanosoma* (Gruby, 1843) y sus respectivos subgéneros, diferenciados por grupo: Stercoraria (color salmón, a la izquierda) y Salivaria (color amarillo, a la derecha).

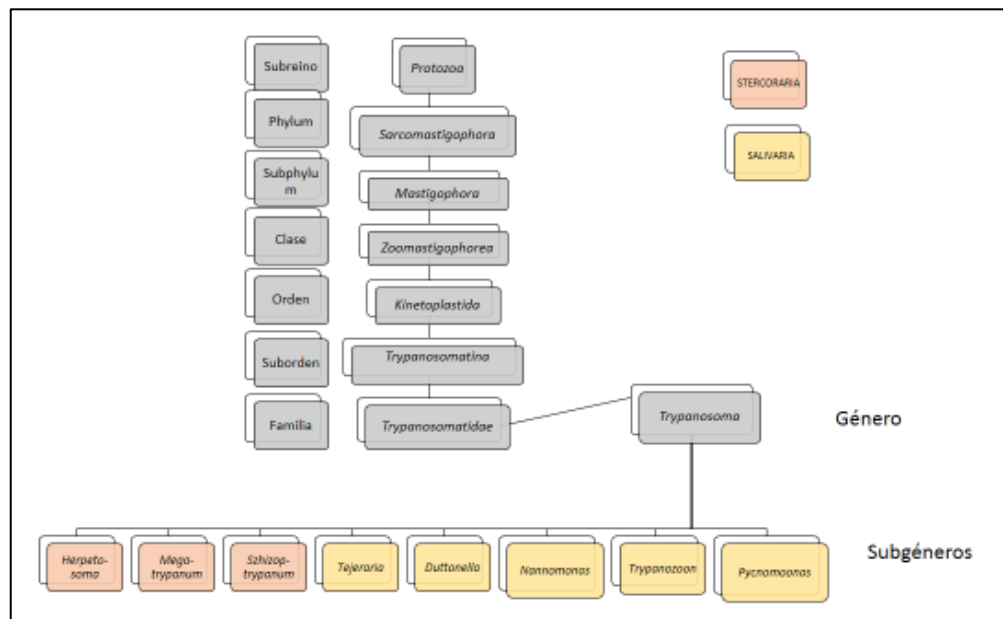


Figura 3. Taxonomía del género *Trypanosoma*. Las especies de mayor interés veterinario se encuentran dentro de los subgéneros *Duttonella* y *Trypanozoon*. Extraído con modificaciones de Desquesnes 2004 de acuerdo a criterios de OMS en 1991.

Las especies de mayor interés médico y veterinario dentro del género *Trypanosoma* grupo "Salivaria", pertenecen a tres subgéneros:

- Subgénero *Nanomonas*: *T. congolense*, *T. simiae* y *T. godfreyi*

- Subgénero *Duttonella*: *T. vivax* y *T. uniforme*
- Subgénero *Trypanozoon*: *T. brucei* (*T. b. brucei*, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*), *T. evansi*, *T. equiperdum*

La identificación morfométrica de los parásitos se estableció hace décadas por Hoare siendo utilizada como criterio diagnóstico (Gómez-Piñeres et al. 2014). Se basan en el tamaño, forma del cuerpo, posición del núcleo y del kinetoplasto y su relación con las extremidades, así como el grado de desarrollo de la membrana ondulante y del flagelo (figura 4).

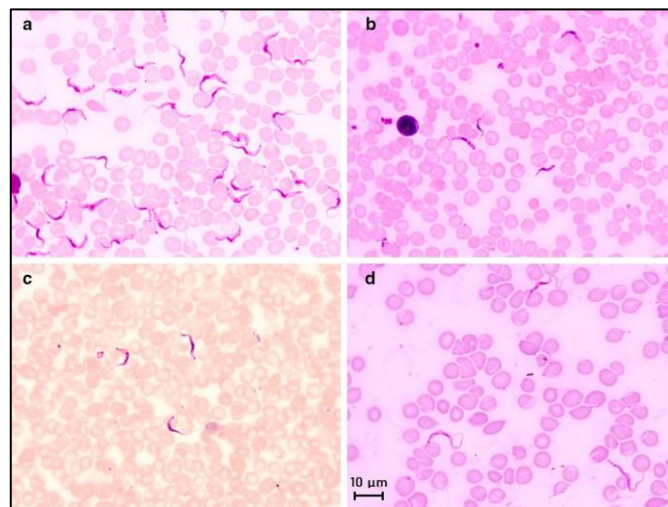


Figura 4. Imagen microscópica de los principales tripanosomas de mamíferos en frotis de sangre fina teñidos con Giemsa. a *Trypanosoma brucei brucei* en sangre de ratón; b *Trypanosoma congolense-type savannah* en sangre de ratón; c *Trypanosoma vivax* en sangre de ganado y d *Trypanosoma lewisi* en sangre de rata. Barra de escala: 10 μ m. (Fuente: Desquesnes et al. 2022a)

1.2 CICLOS DE VIDA DE LOS TRIPANOSOMAS

Los miembros del género *Trypanosoma* son parásitos digenéticos, es decir que dependen de hospederos intermediarios invertebrados para cumplir su ciclo (Kapo et al. 2023). Estos parásitos tienen diferentes estadios durante su ciclo que se clasifican según el lugar donde se encuentra el flagelo (anterior, medio o posterior) y la ubicación del kinetoplasto con respecto al núcleo (Figura 5). No todas las especies pasan por todas las formas ni estas formas son totalmente equivalentes biológicamente entre las especies (Greif 2015).

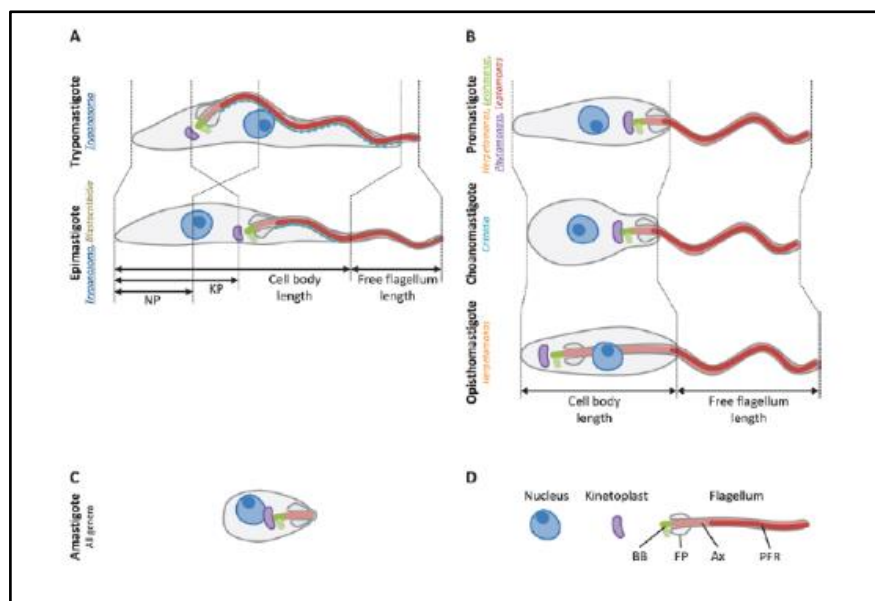


Figura 5. Diagrama de diferentes formas de tripanosomatidos. A. Morfología con flagelo unido lateralmente al cuerpo celular (epimastigota y tripomastigota) B. Morfología con flagelo libre (se extiende desde el bolsillo flagelar). C. Morfología sin flagelo móvil (amastigota). D. Clave de estructuras (núcleo (azul), kinetoplasto (violeta), flagelo (cuerpo basal BB, bolsillo flagelar FP, axonema Ax y paraflagellar rod protein PFR). Métricas: KP, kinetoplasto-posterior, NP, distancia núcleo-posterior. El género en el que cada morfología ocurre (género monofilético se encuentra subrayado) (Fuente: Greif 2015).

Dentro de la familia Trypanosomatidae existen parásitos intracelulares obligados en los mamíferos como el género *Leishmania* sp. y la especie *T. cruzi*. En tanto los tripanosomas Salivaria, foco de esta tesis, permanecen siempre extracelulares en el hospedero mamífero (tanto en el torrente sanguíneo como en los tejidos conectivos) pudiendo estar expuestos al sistema inmune. Este hecho probablemente hizo que desarrollaran un mecanismo de variación antigénica para evadir el sistema inmunológico (Greif et al. 2013).

En algunos casos, especialmente los parásitos del subgénero *Trypanozoon* (*T. brucei*, *T. evansi*), y en menor medida *T. vivax*, pueden alcanzar espacios intersticiales de los tejidos y cavidades serosas (incluido el sistema nervioso central) causando poca parasitemia por lo que no son detectados en las pruebas directas, sobretudo en animales portadores asintomáticos (Buscher et al. 2019). El líquido cefalorraquídeo y el parénquima cerebral pueden ser invadidos por estos tripanosomas provocando una meningoencefalitis no supurativa y encefalomalacia (Constable 2017).

Fuera del hospedero vertebrado o definitivo, existen algunas diferencias durante el ciclo. Dentro del grupo Salivaria se incluyen tripanosomas que deben cumplir con una parte

de su ciclo en su vector (mosca *Glossina* sp.) para poder infectar al hospedero definitivo, como son *T. brucei*, *T. congolense* o *T. vivax*. En la figura 6 se esquematizan los ciclos de vida de estos tripanosomas dónde se muestran las distintas fases del ciclo dentro de estas moscas. Además *T. vivax* puede transmitirse al mamífero sin sufrir modificaciones en el vector, al igual que sucede con *T. evansi*, encontrándose formas más simples (Desquesnes et al. 2022a) y multiplicándose sólo en el hospedero vertebrado por fisión binaria como tripamastigotes (Silva et al. 2002). En consecuencia, existen dos tipos de transmisión: la biológica (o cíclica) y la mecánica.

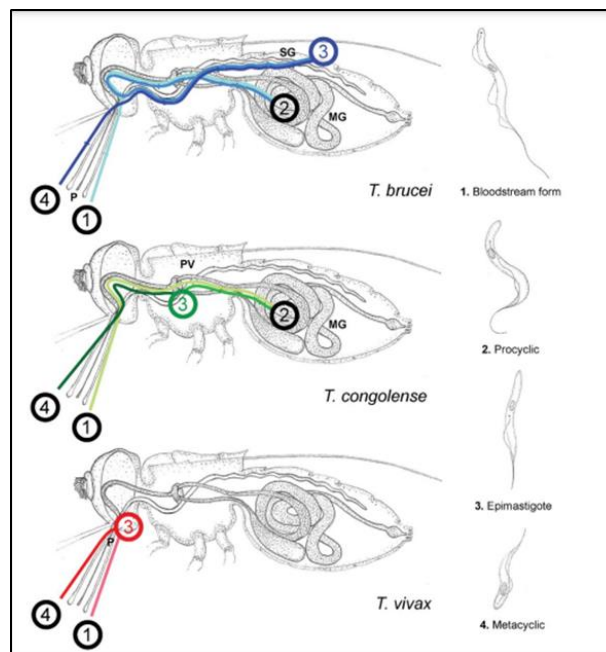


Figura 6. Variación del ciclo de vida entre los tripanosomas africanos. El paso y desarrollo de los tripanosomas africanos a través de la mosca varía según la especie. En la figura se muestra la ruta de cada especie y la posición de cada etapa del desarrollo. Anatomía de la mosca: probóscide (P), intestino medio (MG), glándula salival (SG) y proventrículo (PV). El ciclo de vida se muestra en sus etapas: (1) Ingestión de parásitos de la forma sanguínea; (2) migración de parásitos al intestino medio del insecto con diferenciación en formas procíclicas (*T. vivax* carece de esta etapa); (3) migración anterior a la probóscide (*T. vivax*), proventrículo (*T. congolense*) o glándula salival (*T. brucei*) y diferenciación en formas epimastigotes; y (4) diferenciación en formas metacíclicas e inoculación en el hospedero vertebrado al alimentarse. Extraído de Jackson et al. 2015.

1.3 TRANSMISIÓN MECÁNICA

Los tripanosomas animales pueden ser transmitidos mecánicamente por varios vectores, incluyendo tábanos, moscas de los establos, mosca de los cuernos y garrapatas, entre otros (Gardiner y Wilson 1989; Foil y Gorham 2000, Desquesnes 2004, CFSPH 2018, Souza et al. 2018). En Latinoamérica, los tábanos son reconocidos como importantes transmisores de tripanosomas y se han asociado a brotes en la región (Silva 2006, Batista et

al. 2007, Galiza et al. 2011, Tamasaukas et al 2017). En Uruguay, se han identificado diferentes especies de tábanos en varias zonas, lo que indica su abundancia en la región (Lucas 2019, Krolow et al. 2022).

Otros dípteros como las moscas de los establos (*Stomoxys calcitrans*) y las moscas *Haematobia irritans* también pueden transmitir tripanosomas a través de la alimentación entre animales infestados y animales susceptibles (Desquesnes 2004, Zapata et al. 2017, Souza et al. 2018). En Uruguay *H. irritans* se registró por primera vez en 1991 y desde entonces se considera un gran problema en la ganadería (Marques et al. 1997, Castro et al. 2007, Miraballes et al. 2017). Las garrapatas, como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, son conocidas por transmitir otras enfermedades como anaplasmosis y babesiosis, pero también se ha detectado la presencia de tripanosomas en ellas (Jones y Dávila 2001, Bock 2004, Kocan et al. 2010, Bolívar 2013, Dyonisio et al. 2021). *R. microplus* es muy prevalente en Uruguay por lo que su implicancia en la transmisión de patógenos emergentes debe ser bien investigada. Al cumplir su ciclo en un solo hospedero (ciclo monofásico), la transmisión biológica es importante en agentes cuyos ciclos son transovaricos o transestadiales. Sin embargo, existe transmisión mecánica a través de los machos que son más móviles y podrían transportarse de un animal a otro (Cuore et al. 2013).

Además de los artrópodos, los murciélagos también han sido identificados como reservorios de *Trypanosoma* spp. y pueden actuar como vectores mecánicos de estos parásitos, especialmente de *T. evansi*. La transmisión de *T. evansi* por murciélagos hematófagos ha sido descrita, y se cree que estos animales pueden ser importantes en la dispersión de la enfermedad en la región (Ramírez et al. 2013; dos Santos et al. 2017; Rodrigues et al. 2019). Cabe destacar que la distribución geográfica de los murciélagos vampiros y de *T. evansi* coinciden en gran medida. En la región norte de Uruguay en el año 2007 se diagnosticó por primera vez rabia herbívora transmitida por murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* (Guarino et al. 2013, Botto Núñez et al. 2019) ejemplificando no solo la introducción de una enfermedad emergente y transfronteriza, sino la implicancia que estos murciélagos podrían tener en la transmisión de tripanosomosis en nuestro país.

Se ha reportado la presencia de mosquitos y flebótomos como posibles transmisores de tripanosomas. En el caso de los flebótomos, la especie *Lutzomyia longipalpis* es el principal transmisor de *Leishmania infantum*. Dicho flebótomo se reportó por primera vez en Uruguay en 2010 mientras que el primer diagnóstico de leishmaniasis canina autóctona y

leishmaniasis visceral en humanos fue en 2015 y 2018 respectivamente (Salomón et al. 2011, Satragno et al. 2017, Grill y Zurmendi 2017, Scayola et al. 2019).

También se ha descrito la transmisión mecánica de tripanosomas a través de agujas compartidas para administración de medicamentos, especialmente en áreas de Brasil con alta concentración de establecimientos lecheros por el uso extendido de oxitocina inyectable (Gardiner y Wilson 1989; Silva et al. 2002; Cuglovici et al. 2010, Bastos et al. 2017, Souza et al. 2018).

Otras vías de transmisión como la perinatal están en discusión. Mientras existen algunos reportes de transmisión perinatal para *T. vivax* en bovinos y la transmisión vertical de *T. evansi* en ratas infectadas experimentalmente (Meléndez et al. 1993, Desquesnes 2004, Silva et al. 2013, Constable 2017), un estudio experimental reciente, descartó la transmisión transplacentaria de *T. vivax* en bovinos (de Melo-Junior et al 2024). La transmisión vertical de *T. evansi* se estudió en ratas infectadas experimentalmente observando problemas reproductivos (muerte fetal y perinatal) y muerte de algunas madres. En estos casos *T. evansi* se detectó por PCR en el 80 % de las crías del grupo infectado demostrando la ocurrencia de transmisión transplacentaria y su efecto negativo en las ratas y su descendencia (Campigotto et al. 2017).

Además, la transmisión oro-digestiva de tripanosomas también se ha informado en perros y otros carnívoros debido a la ingestión de carne cruda infestada de parásitos. Esto ha sido confirmado experimentalmente para *T. brucei* y *T. evansi* en perros, gatos, tigres y ratones (Desquesnes 2004).

1.4 SIGNOS CLÍNICOS Y LESIONES POSTMORTEM

No existen signos patognomónicos que ayuden al diagnóstico de las tripanosomosis. Sumado a esto existen diferentes presentaciones dependiendo de la especie de tripanosoma, especie y raza del animal, manejo, inmunidad previa específica o inespecífica, factores nutricionales, enfermedades intercurrentes y otros factores que puedan producir estrés (Desquesnes 2004; Constable 2017; Ramírez 2017; Pereira et al. 2018).

En la enfermedad producida por *T. vivax* los signos pueden aparecer entre 9 a 60 días (Moleta 2022) luego de la infección. Aparte del signo clásico que es la anemia se describen otros como: fiebre, apatía, anorexia, depresión, descarga ocular, opacidad corneal

unilateral, pérdida de condición corporal y producción de leche, agrandamiento de linfonódulos superficiales, palidez de mucosas, diarrea ocasional. Las hembras pueden presentar ciclo estral irregular y abortos. Los animales pueden morir en 2 a 4 meses o más (Constable 2017, OMSA 2021a). La fiebre se presenta coincidiendo con el pico de parasitemia pudiendo llegar a 41°C (Ramírez 2017). El curso puede ser agudo, con periodos subagudos o crónicos, terminando con muerte o recuperación aparente o permanente (Constable 2017; Ramírez, 2017), pudiendo recrudecer ante factores de estrés (CFSPH 2018). En la fase crónica además pueden presentarse edemas, emaciación e insuficiencia cardíaca congestiva por la anemia persistente (Moleta 2022).

Existen varios reportes de signos nerviosos como depresión, incoordinación, temores musculares, estrabismo y ceguera transitoria o permanente (Constable 2017, Moleta 2022). En Brasil cuadros con signos reproductivos y nerviosos fueron reportados por varios investigadores (Madruga 2004, Batista et al. 2007; Osório et al. 2008, Silva et al. 2009, Galiza et al. 2011, Batista et al. 2017).

T. vivax debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial de aborto en bovinos y ovinos (Bezerra y Batista 2008, Galiza et al. 2011, Silva et al. 2013, Batista et al. 2017, 2022). En Colombia la “oleada” de abortos, se describe como uno de los signos clásicos de la enfermedad, asociada con mala condición corporal de las vacas y nacimiento de terneros débiles, acompañado de opacidad de córnea (Benavides et al. 2016).

Las lesiones postmortem en bovinos infectados con *T. vivax*, pueden incluir caquexia, aumento del tamaño de linfonódulos, hepatomegalia y esplenomegalia, exceso de líquido en cavidades del cuerpo y hemorragias petequiales. En animales muertos en etapas crónicas los linfonódulos ya no se encuentran agrandados y se puede encontrar miocarditis (OMSA 2021a).

T. evansi, por su parte, invade la circulación sanguínea y/o linfática luego de multiplicarse en el sitio de inoculación, produciendo picos febriles y respuesta inflamatoria, con períodos afebriles.

En equinos se describen dos presentaciones diferentes: una caquetizante y otra neurológica central. En la forma caquetizante se observa emaciación progresiva con conservación del apetito, incoordinación e inestabilidad, atrofia de músculos de miembros pélvicos, anemia con palidez o ictericia de mucosas, edemas subcutáneos en partes declives del cuerpo, letargia, abortos y adenomegalia. La forma neurológica central puede darse como

fase terminal de la anterior o sin signos previos. Los signos incluyen ataxia, ceguera, andar en círculos, hiperexcitabilidad, apatía, déficit propioceptivo, desvío de cabeza, movimiento de pedaleo, posición de perro sentado y presión de cabeza contra objetos (Giaretta 2022), por lo que debería considerarse siempre en un diagnóstico diferencial de encefalitis en zonas enzooticas (Rodrigues et al. 2009).

Los animales salvajes, como el ciervo, el carpincho o el coatí, pueden resultar infectados y enfermar (e incluso morir), pero también pueden ser importantes reservorios. Los animales sometidos a estrés, son más susceptibles a la infección (OMSA 2021b).

Debido a la gran diversidad de signos, presentaciones inespecíficas y ausencia de signos patognomónicos antemortem y postmortem, el diagnóstico diferencial es muy amplio por lo que su confirmación se debe basar en pruebas de laboratorio (OMSA 2021a).

1.5 TRATAMIENTO Y CONTROL

Varios fármacos pueden tener efecto sobre los tripanosomas, aunque en la región por su disponibilidad las más usadas son: aceturato de diaminazine o clorhidrato de isometidina (no comercializada en Uruguay). Se recomiendan tratamientos estratégicos ya que se ha visto resistencia (Moleta 2022). También se han evidenciado recidivas, reinfecciones, sobrevivencia de parásitos resistentes, o que los parásitos no están al alcance de los fármacos ya que éstos no atraviesan la barrera hematoencefálica (Giaretta 2022). Esto implica un problema ya que pueden quedar animales portadores crónicos que sigan movilizándose y diseminando la enfermedad (Jones y Dávila 2001).

En cuanto a la decisión de instaurar un tratamiento ante resultados positivos a las pruebas serológicas existen diferentes opiniones. Algunos investigadores recomiendan el tratamiento solo si aparecen los signos clínicos, y otros recomiendan un tratamiento preventivo a todos los animales del rodeo positivo como acción proactiva para disminuir posibles pérdidas por infestaciones subclínicas (Souza et al. 2018).

Como control se menciona el control de los vectores implicados, así como la desinfección de agujas utilizadas entre animales (Giaretta 2022).

2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 SITUACION REGIONAL

2.1.1 *Trypanosoma vivax*

En Latinoamérica la prevalencia de *T. vivax* es muy variable existiendo países con prevalencia conocida mayor al 30% como Colombia y Venezuela, y epizootias frecuentes (Desquesnes 2004). En Ecuador, una investigación reciente determinó una seroprevalencia de IgG anti-*Trypanosoma* spp. del 19,1% en bovinos (Maldonado et al. 2024).

En Brasil se han realizado varios reportes en diferentes zonas y especies animales (Madruga et al. 2006, Linhares et al. 2006, Silva et al. 2009, Cadioli et al. 2012, Batista et al. 2007, Batista et al. 2017) con infecciones que van desde agudas a crónicas y manifestaciones clínicas o subclínicas. Se indica que la seroprevalencia en rumiantes varía según la región de Brasil, estando entre el 20 al 60% con una tendencia al aumento desde 2007 (Souza et al. 2018). En el Pantanal del Estado de Mato Grosso se encontró una prevalencia de 56% pero con diferencias significativas en distintos municipios. En el Estado de Pará fue menor, reportándose 30,7% en general, aunque en Ilhá de Marajó (ubicado al norte de este estado) fue significativamente mayor (casi 70%) (Madruga et al. 2006). En el estado de Río Grande do Sul se evaluaron sueros bovinos detectando una seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma* spp. de 31% en Uruguaiana y 24% en Passo Fundo, ambas regiones limítrofes con Uruguay (Samoel et al. 2023).

En rodeos lecheros en Brasil, se reportaron brotes en la zona semiárida de Paraíba (Nordeste de Brasil) entre mayo y agosto de 2002 con 64 animales enfermos de un total de 130 y 11 muertos (Batista et al. 2007). En Pernambuco y Alagoas, se documentaron tres brotes con 109 animales enfermos y más de 40 muertos, ocurridos entre diciembre de 2013 y 2014 (Andrade Neto et al. 2019). En el primer brote reportado en un rodeo lechero de Minas Gerais se estimó una caída del retorno financiero bruto del 47% por las pérdidas producidas (mortalidad, abortos, tratamientos y disminución de producción de leche) (Abrão et al. 2009).

En un estudio retrospectivo en los brotes de Minas Gerais, se encontró que *T. vivax* afectaba más a hembras que a machos. Estos autores lo explicaban por el mayor estrés que pueden tener vacas lecheras, así como el uso de agujas compartidas antes del ordeño. El contacto más estrecho con el animal en estas explotaciones puede aumentar la detección de animales enfermos (García et al. 2014).

También en Brasil, pero en ovinos, se reportó un brote importante en el estado de Paraíba, donde de un total de 306 animales, enfermaron 240 y se murieron 216. A pesar del alto impacto en ovinos en dicho brote, los bovinos y búfalos que se encontraban en el mismo establecimiento no enfermaron, sugiriendo que *T. vivax* se introdujo por búfalos portadores asintomáticos y luego se transmitió por tábanos y/o iatrogénicamente (Galiza et al. 2011). Se ha destacado además el rol de los burros (*Equus asinus*) errantes como portadores sanos de *T. vivax* en ciertas regiones de este país (Rodrigues et al. 2015).

Se han reportado otros factores que favorecieron a la diseminación de la enfermedad por el continente sudamericano como cambios en el ecosistema. Por ejemplo, Jones y Dávila describe la construcción acelerada de carreteras en el interior de Brasil a principios de 1990 como un factor que pudo haber incidido en la aparición de la enfermedad en el área del Pantanal por la facilidad en el tránsito de animales desde el norte de Brasil, diseminándose luego a Bolivia. El movimiento de animales portadores a través de un país implica un riesgo de aparición de la enfermedad en áreas libres y una vez introducida, se puede transmitir mecánicamente (Jones y Dávila 2001, Silva 2006). Durante los brotes en el pantanal brasileño y boliviano, el impacto financiero debido a muerte de animales, abortos, pérdidas de fertilidad y costos de tratamiento se estimó en 160 millones de dólares con tratamiento y 700 millones si no se trataba, al extrapolar a toda la región (Seidl et al. 1999).

En Argentina, *T. vivax* se describió por primera vez en 2006 en bovinos en la provincia de Formosa (región noreste). Luego se reportaron varios brotes con altas morbilidad y mortalidad (Monzón et al. 2013, Abdala et al. 2020, Ruiz et al. 2018, 2021). La región del Gran Chaco (provincias de Formosa, Chaco y norte de Santa Fe) se considera endémica (Florentin et al 2021, Mazzucco et al 2022, Bontempi et al. 2024).

Durante el verano/otoño de 2016 y 2017 se observaron los primeros brotes en la zona central de la Provincia de Santa Fe, afectando algunos rodeos lecheros (Ruiz et al. 2018) y en 2021 se reportó en Córdoba (Ruiz et al. 2021). En un establecimiento lechero de Santa Fe, se presentaron 17 abortos, diarrea, mala condición corporal, baja o nula producción de leche y muerte de vacas (7,5%). Las pérdidas totalizaron 58.802 USD contabilizando abortos, muertes, venta de animales improductivos y gastos por tratamiento específico. Por tratarse de una enfermedad desconocida en ese momento, la demora en realizar el diagnóstico exacerbó el impacto. El tratamiento de la totalidad de los bovinos adultos con diminazene detuvo el brote (Abdala et al. 2020, Bontempi et al. 2024). Se ha reportados *T.*

vivax en equinos, aunque sin gran impacto sanitario (Silva et al 2011, Desquesnes et al. 2013).

2.1.2 *Trypanosoma evansi*

Las prevalencias reportadas en equinos también varían al igual que *T. vivax*, según la región y prueba diagnóstica. En Venezuela mediante la prueba de ELISA se detectó una seroprevalencia del 81,7% en caballos de tiro y del 57,14% en caballos de establo (Reyna-Bello et al. 1998).

En Brasil *T. evansi* afecta principalmente a equinos con prevalencia que varía según la región (Silva et al. 2010). En el Pantanal brasileño se considera enzoótico, aunque también se ha registrado una situación de inestabilidad, similar a lo que sucede con *T. vivax*. En esta región se estimó que la prevención de la enfermedad evitaría la muerte de 6462 animales anualmente (Seidl et al. 2001). Silva et al. (2010) describieron los aspectos clínicos y hematológicos encontrados en dos brotes diferentes en perros y equinos con mortalidad del 51% y 20% respectivamente. En el sur de Brasil, han ocurrido casos aislados y en brotes en equinos, y se ha reportado *T. evansi* en bovinos con sintomatología clínica (Silva et al. 2010, Silva et al. 2018)

En Argentina existen varias descripciones en equinos (Monzón et al. 1995a, b, 2013, Pertile et al. 2020) y caninos (Battistoni et al. 2016, Bazzalo et al. 2018). En el brote descrito por Pertile et al. (2020) se constató la muerte de 19 equinos que presentaban pérdida de peso progresiva, inapetencia, hipertermia, debilidad, linfadenomegalia, mucosas pálidas, secreciones nasales y epíforas, edemas en zona de pecho, abdomen y miembros. Este brote ocurrió en Monte Caseros (Corrientes) localidad vecina a la localidad uruguaya de Bella Unión (Artigas) al otro lado del Río Uruguay.

2.1.3 *T. evansi* en animales silvestres

El papel de los animales salvajes o silvestres en la epidemiología de la Surra necesita más investigación. En Sudamérica se han publicado algunos trabajos en tal sentido. En Venezuela un estudio de 559 carpinchos o capibaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) detectó una prevalencia del 9% usando una prueba de visualización directa y 50% presentó anticuerpos en una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Arias et al. 1997).

En 2016 Magalhães-Matos et al. reportaron por primera vez la detección molecular de *T. evansi* en la región amazónica brasileña en mapache sudamericano o mano pelada (*Procyon cancrivorus*). Mientras que se ha demostrado infección experimental en coatíes

sudamericanos (*Nasua nasua*) con producción de signos clínicos (depresión, debilidad, letargia y palidez), parasitemias persistentes y relativa tolerancia a la enfermedad (síntomas leves) por lo que pueden representar un rol muy importante en la epidemiología de *T. evansi* en regiones enzooticas (Herrera et al. 2004).

En el Pantanal brasileiro se encontró en coatíes, perros y pequeños animales roedores silvestres. Se ha reportado también en carpinchos de la región amazónica en 1998 pero es posible que el parásito haya llegado allí hace mucho tiempo.

En Argentina se detectó en carpinchos (González et al. 2003, Santa Cruz et al. 2013, Eberhardt et al. 2014) y recientemente se encontró en ciervos de los pantanos (*Balstocerus dichotomus*) (Orozco et al. 2020).

2.2 SITUACION EN URUGUAY

En Uruguay como fue mencionado, sólo se ha reportado y notificado *T. evansi*, cuyo diagnóstico directo se realizó en perros en los departamentos de Rivera y Artigas, ambos limítrofes con Brasil. El primer caso se trató de un animal de raza Cimarrón con signos clínicos en octubre de 2016 muriendo cuatro semanas después. Se constató alta parasitemia y se realizó la caracterización molecular del aislamiento del parásito siendo el primer reporte y aislamiento del parásito causante de Surra en Uruguay (Greif et al. 2018). En la segunda comunicación se describe la afección de dos perros que eran utilizados para la caza del jabalí (*Sus scrofa*) en montes de arroyos. Los signos clínicos comenzaron en setiembre y noviembre de 2017, muriendo aproximadamente un mes después. En base al estudio epidemiológico en este reporte se sugiere que la transmisión mecánica por dípteros (probablemente tábanos) fue la responsable, y no la transmisión oro- digestiva ya que los otros perros que convivían y realizaban las mismas actividades que los enfermos, no estaban infectados (Parodi et al. 2018). En el año 2020 se realizó la notificación del hallazgo de equinos positivos a la prueba serológica autorizada por la OMSA (OMSA 2023).

La afectación al comercio y movimiento internacional de equinos con infestación de *Trypanosoma* spp. no ha sido bien cuantificada en nuestro país, aunque probablemente signifiquen pérdidas económicas muy importantes.

2.3 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Si bien la tripanosomosis puede sospecharse en áreas endémicas, la disponibilidad de técnicas adecuadas para el diagnóstico de laboratorio se hace imprescindible por la presentación de signos clínicos y hallazgos inespecíficos, fácilmente confundibles con otras enfermedades prevalentes en la región y que podrían además coexistir (OMSA 2021a, b; Pereira et al. 2018).

Las pruebas para el diagnóstico laboratorial se pueden clasificar en dos grandes grupos: pruebas directas o pruebas indirectas, dependiendo de si apuntan a identificar el agente o si buscan detectar respuesta inmunitaria al parásito, respectivamente. Debido a las fluctuaciones en la parasitemia, la eficacia de cada prueba puede variar. La elección de una prueba u otra dependerá en gran medida de las necesidades o propósitos del estudio, lo que a su vez estará dado principalmente por el grado de sensibilidad y especificidad, así como la facilidad de implementación y el costo (OMSA 2021a, OMSA 2021b, Desquesnes et al. 2022a).

En los siguientes puntos se realiza un repaso de las principales técnicas utilizadas para el diagnóstico.

2.3.1 Detección directa

2.3.1.1 Microscopía

Las pruebas de microscopía directa se basan en la visualización del parásito en la sangre, pudiendo hacerse directamente con frotis de sangre fresca o frotis delgados teñidos con Giemsa (GSBS) que permiten la identificación a nivel de subgénero en base a la morfología del parásito. Se puede aumentar la sensibilidad concentrando los parásitos con microcentrifugación. Estas son la técnica de Woo (concentración de hematocrito o HCT) y la técnica de Murray (BCT, capa leucocitaria, “Buffy Coat”). La última deriva de la anterior pero el tubo capilar se rompe a la altura de la capa leucocitaria poniéndola en un portaobjeto para examinarla luego en el microscopio (OMSA 2021a, Desquesnes et al. 2022a).

Estos test directos tienen la desventaja de tener baja sensibilidad, pudiendo ser útiles en casos de enfermedad aguda con picos altos de parasitemia (Constable 2017; OMSA 2021a). La técnica de Woo en ovejas infectadas experimentalmente arrojó una sensibilidad casi nula cuando la parasitemia era menor a 60 parásitos/ml de sangre (Desquesnes y Tresse, 1996). La prueba de BCT tiene menos repetibilidad y reproducibilidad que la técnica de Woo

debido a la variación en la habilidad técnica para romper el tubo capilar y la caída de la capa leucocitaria sobre el portaobjetos.

Dentro de las ventajas de ambas pruebas podemos citar: bajo costo y facilidad de implementación, posibilidad de diferenciar otros hemoparásitos si se tiñen posteriormente, y medición del hematocrito o volumen de empaquetado celular (PCV). Esto último es útil para estimar el grado de anemia lo cual puede orientar las investigaciones o decidir si una muestra se procesará por otras técnicas, limitando el número de muestras analizadas y disminuyendo los costos (Desquesnes et al. 2022a).

En general, el criterio de interpretación para un resultado negativo no significa ausencia de infección ya que un parásito puede permanecer sin ser detectado por periodos largos. Por el contrario, un resultado positivo puede verificar la infección de un animal por un tripanosoma específico dependiendo del nivel de especificidad de la técnica y el contexto epizootiológico (Desquesnes et al. 2022a).

2.3.1.2 Técnicas de detección de ADN

Se han desarrollado varios pares de cebadores para la amplificación de ADN mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con recomendaciones específicas de la OMSA para tripanosomas africanos en América Latina (Desquesnes et al. 2022a, b) En tal sentido para PCR monoespecíficas los cebadores recomendados son: TBR1 y TBR2 (subgénero *Trypanozoon*) y TVW1 y TVW2 (*T. vivax*) (Moser et al. 1989, Masiga et al. 1992, OMSA 2021a). Estos cebadores tan específicos de especie pueden requerir varias PCR para identificar diferentes especies de tripanosomas.

La sensibilidad mejora cuando los cebadores se dirigen a genes con mayor número de copias. Los ITS o espaciadores transcritos internos de ADN ribosómico son buenos candidatos ya que permiten la identificación específica de los tripanosomas africanos en infecciones únicas o mixtas, aunque debería realizarse un buen diseño y comparación entre los cebadores con muestras de diferentes regiones, así como validar los distintos métodos de extracción de ADN (Desquesnes et al. 2001b, Desquesnes y Dávila 2002, Njiru et al. 2005).

En América se recomiendan diferentes cebadores para detectar distintas especies de tripanosomas en equinos, aunque no sea posible distinguir molecularmente entre *T. equiperdum* y *T. evansi*, y en mamíferos salvajes (por ejemplo, detectar *T. cruzi* y *T. rangeli*). Otros cebadores desarrollados en base a las regiones altamente conservadas ITS1 son los

cebadores TRYP1 que permiten la detección conjunta de varios tripanosomatidos incluyendo *T. lewisi*, *T. cruzi* y *Leishmania* spp. (Desquesnes et al. 2022a).

Las técnicas de PCR tienen limitaciones, pero pueden mejorar la sensibilidad y especificidad en comparación con métodos tradicionales (Constable 2017). Al igual que en las técnicas directas la centrifugación de la muestra puede aumentar la posibilidad de encontrar parásitos (Desquesnes y Davila 2002). Los falsos positivos y falsos negativos pueden ocurrir por diversas razones, por lo que se deben incluir siempre controles negativos y positivos en cada análisis, así como controles internos y controles durante la extracción de ADN (Desquesnes y Davila 2002, Desquesnes et al. 2022a). Una causa importante de falsos negativos puede ser el tratamiento tripanocida, ya que elimina el ADN parasitario en 1 a 2 días (Desquesnes y Davila, 2002).

Se mencionan otras variantes moleculares como la amplificación isotérmica de ADN o LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) (Cadioli et al. 2015, Castilho-Neto et al. 2021) o PCR de tiempo real (para *T. evansi* en hospederos y vectores) con alta sensibilidad y especificidad, pero su uso aún no ha sido ampliamente validado además de tener alto costo y necesitar personal capacitado (Buscher et al. 2019, Desquesnes et al. 2022a). A pesar de los avances en PCR, el costo y la tecnología siguen siendo limitantes para su uso rutinario. Se destaca la importancia de considerar que un animal puede tener varios tripanosomátidos, por lo que es crucial realizar pruebas específicas en el contexto geográfico y especie animal (Desquesnes et al. 2022a). También se han reportado metodologías múltiples para distintos hemoparásitos en una sola reacción lo cual implica mayor eficiencia y rapidez en el diagnóstico, y podría ser de mucha utilidad en nuestro medio (Tananyutthawongse et al. 1999, Bolívar 2013).

2.3.2 Detección indirecta

Las técnicas indirectas para detectar la respuesta inmune son fáciles de aplicar y tienen un bajo costo, siendo útiles para procesar múltiples muestras simultáneamente. Los métodos de detección de anticuerpos pueden evidenciar el contacto entre el hospedero y el parásito con alta sensibilidad, pero no son eficaces para determinar la infección activa por la persistencia de los anticuerpos. Son útiles en encuestas epidemiológicas y la detección de animales sospechosos, siendo altamente específicos para algunos géneros como *Anaplasma*, *Babesia* y *Theileria*, pero menos específicos para la familia Trypanosomatidae debido a las

reacciones cruzadas (Uzcanga et al. 2002, Desquesnes et al. 2001a, Camargo et al. 2004, Desquesnes et al. 2022a).

La OMSA validó cuatro técnicas principales de detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma*: 1) la inmunofluorescencia indirecta (IFI), 2) los antígenos solubles de lisado de células enteras (WCLSA) para ELISA (por sus siglas en inglés: Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de detección de anticuerpos, 3) la prueba de fijación complemento (CFT; utilizada para *Durina*), 4) la prueba de aglutinación en tarjeta (CATT/*T. evansi* utilizado para Surra. Para *T. vivax* se recomienda IFI y ELISA (OMSA 2021a), mientras que para *T. evansi* se han desarrollado buenos ELISA para la detección de anticuerpos y antígeno circulante (Desquesnes 2017, OMSA 2021b, Desquesnes et al 2022a).

En el siguiente apartado describiremos la técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra *T. vivax* y *T. evansi*.

2.3.2.1 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA es una técnica serológica de unión primaria (unión de antígeno-anticuerpo) y es uno de los métodos de inmunoanálisis más importantes en medicina veterinaria (Tizard 2009, Wright et al. 1993). Existen muchas variantes como el ensayo de ELISA indirecto o el ELISA de captura tipo “sandwich” (Figura 7), pero los fundamentos siempre se basan en las siguientes etapas:

- ✓ Recubrimiento/captura: inmovilización de antígenos/anticuerpos en la superficie de pocillos de microplacas de poliestireno.
- ✓ Bloqueo: adición de una proteína irrelevante u otra molécula para cubrir superficies vacías de los pocillos de la placa que no hayan sido recubiertos en la etapa anterior
- ✓ Detección: incubación con anticuerpos antígeno-específicos que se unen por afinidad a los antígenos.
- ✓ Medición de señal: detección de la señal generada (Crowther 2009; Thermoscientific, Guide).

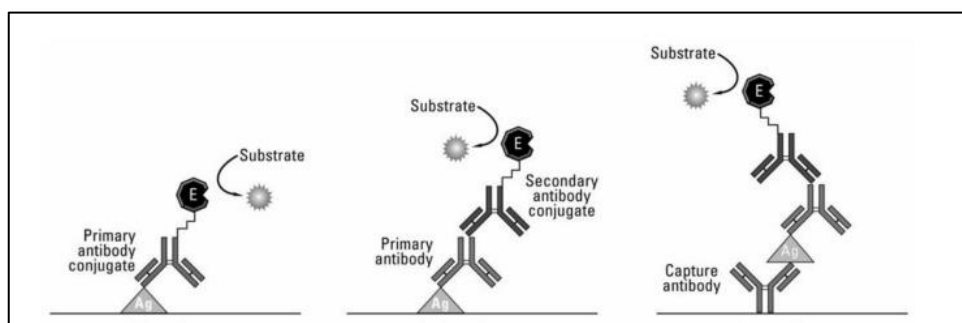


Figura 7. Diagramas de los ensayos de ELISA más utilizados: ELISA directo (izquierda), ELISA indirecto (centro), ELISA de captura tipo “sandwich” (derecha). Extraído de “Guía y Protocolos de ELISA” (Thermo Scientific Guide)

La OMSA recomienda ELISA para *T. vivax*, estando validada para evaluar la presencia o ausencia en una población determinada, conocer si un individuo está libre antes de un movimiento o para contribuir con políticas sanitarias. Además, también es recomendada y validada para evaluar prevalencias y realizar vigilancia epidemiológica de tripanosomosis animales transmitidas por moscas tse-tsé (OMSA 2021a). También se sugiere para la detección de anticuerpos IgG contra *T. evansi* y detectar animales libres de la enfermedad, previo a movimientos o durante cuarentenas (Monzón et al 1995b, OMSA 2021b, Bontempi et al. 2024).

Se han desarrollado diversos ELISAs para la detección de anticuerpos contra tripanosomosis en animales (Luckins 1977, Ferenc 1990, Desquesnes 1997, Hopkins 1998, Davison et al. 1999, Rebeski et al. 1999, Reid y Copeman 2003, Monzón et al. 2010) y recomendaciones para la producción y estandarización de los antígenos utilizados (Pillay et al. 2013, Tamasaukas et al. 2017, Bossard et al. 2021).

La detección de anticuerpos en suero mediante ELISA tiene la ventaja de poder ser usado para estudios a gran escala. El antígeno estándar que se utiliza para este ensayo deriva de parásitos aislados del torrente sanguíneo producidas en animales de laboratorio y se purifican por cromatografía de intercambio aniónico de dietilaminoetanol (DEAE) (Desquesnes et al. 2022a). Se ha recomendado el lisado soluble de células completas (en inglés WCLSA) (Bossard et al. 2021). Como anticuerpo secundario se recomienda usar una proteína anti-IgG específica de la especie animal a estudiar. Sin embargo, puede usarse conjugado de proteína A para animales en general, si no se cuenta con la proteína específica (Desquesnes et al 2022b).

La detección de anticuerpos IgG contra *T. vivax* es útil para la detección de la enfermedad, con seroconversión positiva en rumiantes alrededor de 10 a 20 días después de la infección (Fidelis Junior et al. 2019, Desquesnes 2022a, b). Si bien puede dirigirse tanto a la detección de IgM como de IgG (Vos y Gardiner 1990, Bassi et al. 2018) se prefiere esta última ya que puede detectarse durante varias semanas post-tratamiento o autocuración (2-4 meses) siendo más constante en sus niveles (Desquesnes 2017, Desquesnes et al 2022b).

El ELISA se basa en el uso de sueros de referencia positivos y negativos para garantizar la calidad de la prueba. Los resultados se expresan generalmente en relación a los controles negativos y positivos, lo que facilita la estandarización entre laboratorios y ensayos. El IDON (Índice de la Densidad Óptica con respecto a los controles Negativos) es un índice que relaciona la DO de la muestra problema con la DO de los controles negativos. Cuando el IDON es menor a 1 se categorizan como negativas y mayor o igual a 1 como positivas (Vicco et al 2013, Bontempi et al. 2024). Otro método de interpretación de resultados es el Porcentaje Relativo de Positividad (PRP) estableciendo un valor de corte previamente con muestras positivas y negativas conocidas (Wright et al 1993, Bossard et al 2021)

La especificidad para detectar tripanosomosis en animales es alta a nivel de género ya que no presenta reacciones cruzadas con otros hemoparásitos, como *Theileria* spp., *Babesia* spp. o *A. marginale* ni con tripanosomas apatógenos como *T. theileri* (subgénero *Megatrypanum*), pero baja a nivel de especie debido a posibles reacciones cruzadas entre especies patógenas (Desquesnes et al. 2001a, Uzcanga et al. 2002, Camargo et al. 2004, 2015). Desquesnes et al. (2001a) mencionan que en un sistema homólogo (antígeno uniéndose a anticuerpos específicos de especie) la intensidad de la respuesta es generalmente mayor que en sistemas heterólogos, lo que podría ser útil para determinar cuándo existe reacción cruzada entre especies del mismo género.

Existen limitaciones en el desarrollo de un protocolo de ELISA validado, como ser la producción de antígeno a partir de parásitos locales, laboratorios especiales para su producción (Osório et al 2008) y obtener sueros de referencia. A pesar de esto, el ELISA sigue siendo una herramienta útil para estudios seroepidemiológicos a gran escala (Desquesnes et al. 2022a).

3 CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La prueba de ELISA es una técnica importante en medicina veterinaria que consiste en la unión de antígenos y anticuerpos. Se recomienda su uso para detectar la presencia de enfermedades como *T. vivax* y *T. evansi* en bovinos y equinos, así como para controlar la prevalencia y realizar vigilancia epidemiológica. En América Latina, se ha observado un aumento en la propagación de la tripanosomosis, con registros en Brasil y Argentina. En Uruguay, se ha detectado la presencia de *T. evansi* en perros clínicamente afectados, pero hasta el momento no se ha estudiado la presencia de *T. vivax* en el ganado nacional. Es necesario realizar un diagnóstico diferencial con otras enfermedades similares en la región como ser babesiosis y anaplasmosis (Solari et al. 2013). El tratamiento con ciertos medicamentos puede enmascarar la enfermedad y contribuir a su dispersión.

Las enfermedades producidas por tripanosomas africanos causan importantes pérdidas a nivel productivo y reproductivo, llegando en algunos casos a la muerte de animales enfermos, abortos y mortalidad neonatal, sin contar las pérdidas por enfermedad subclínica. El diagnóstico diferencial en bovinos es amplio, incluyendo otras enfermedades que producen anemia (ej. babesiosis y anaplasmosis), abortos (ej. brucelosis y leptospirosis) y sintomatología nerviosa (ej. rabia herbívora), las cuales son prevalentes en la región. En equinos es necesario el diagnóstico diferencial con varias enfermedades incluyendo la Encefalomiелitis Equina del Oeste.

La región norte del Uruguay comparte más de 1000 kilómetros de frontera con Brasil (Mazzei y De Souza, 2013). Esto determina que sea una zona de vigilancia prioritaria de posible ingreso de enfermedades transfronterizas o emergentes, cuyo sistema de alerta y diagnóstico, debe ser rápido y completo. Las variables atmosféricas de los últimos años con un incremento importante en lluvias y temperatura pueden repercutir en mayor presencia de dípteros, descritos como el principal vector de estos parásitos en América del Sur. El diagnóstico reciente en el norte de Uruguay de *T. evansi* en perros hace presumir la posible aparición también de *T. vivax* ya que ambos son transmitidos mecánicamente en nuestro continente compartiendo vías de transmisión y reservorios. Además, se reporta la presencia de *T. vivax* en bovinos en regiones cercanas a nuestro país.

Agravando la situación, el tratamiento con diaceturato de 4,4' diazoaminodibenzamida (o diaminazeno aceturato) e imidicoarb que son efectivos para *Babesia* spp. (Aguiar et al. 2002, Solari et al. 2013), pueden no ser efectivos en eliminar

tripanosomas, atenuando la enfermedad clínica, pero tornando al animal portador crónico, lo que contribuiría a la mayor dispersión de la enfermedad.

Por lo tanto, es fundamental contar con un diagnóstico preciso y diferencial para conocer la situación actual. Asimismo, contar con un test de “screening” para determinar indirectamente si estos parásitos se encuentran en los rodeos permitirá establecer nuevas líneas de investigación a partir de aislados locales. Por lo antedicho, es que planteamos las siguientes hipótesis.

- Mediante un ensayo de inoculación experimental de Extracto Crudo de Proteína Total de *Trypanosoma vivax* cepa Y486 en un bovino, se puede obtener suero control positivo con valores adecuados de densidad óptica (DO) que permita el desarrollo de un ensayo de ELISA indirecto utilizando extracto total de proteínas de la cepa mencionada.
- El estudio serológico mediante el protocolo desarrollado permitirá establecer la presencia de anticuerpos reaccionantes en bovinos y equinos a por lo menos un tripanosoma en un lugar y tiempo determinado

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un ensayo de ELISA indirecto “in house” para la búsqueda de bovinos y equinos reaccionantes a *Trypanosoma* spp. en muestras remitidas al Laboratorio Regional Norte (LRN) de la División de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) de Tacuarembó.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener un suero sanguíneo de origen bovino con anticuerpos policlonales que reconozca las proteínas presentes en el extracto total de un lisado del parásito *Trypanosoma vivax*
2. Estandarizar un protocolo de ELISA indirecto “in house” con antígeno de *Trypanosoma vivax* y evaluación de su performance con sueros positivos y negativos previamente caracterizados.
3. Evaluar la performance diagnóstica de la prueba de ELISA estandarizada con sueros bovinos remitidos al LRN de DILAVE
4. Evaluar la performance de la prueba con sueros de equinos y analizar las reacciones cruzadas con sueros equinos positivos a la prueba de CATT-*T. evansi*
5. Comparar resultados obtenidos en los sueros de bovinos y equinos procesados por ELISA con antígenos *T. vivax*, *T. evansi* y CATT-*T. evansi*
6. Realizar análisis geográfico de la seroprevalencia hallada.

5 ESTRATEGIA DE INVESTIGACION

Debido a la dificultad de obtener un volumen suficiente de sueros bovinos positivos de brotes en la región, se realizó un ensayo de inmunización experimental para obtener suero con anticuerpos policlonales de origen bovino como control positivo del ELISA para cumplir con el objetivo específico **(OE) 1**. Este punto es crucial para la puesta a punto del ensayo. Para ello se realizó el protocolo que se anexa al final del trabajo (anexo I).

Para cumplir con el **OE 2**, una vez que se obtuvo el suero control positivo, se puso a punto un protocolo de ELISA indirecto estándar utilizando como antígeno extracto total de proteínas de parásitos *T. vivax* cepa Y486 (iELISA-*T. vivax*). Dicho extracto se obtuvo mediante inoculación de ratones según el protocolo aprobado por la CEUA del Institut Pasteur de Montevideo (IPM) (N° Protocolo: 004-17) que se adjunta (anexo II). En esta etapa se evaluaron diferentes tiempos, concentraciones de antígeno, temperaturas y tiempos de incubación, composición de buffer de bloqueo, número y temperatura de lavados, así como anticuerpos secundarios y reactivos de revelado. A su vez como forma de validar el antígeno producido en el IPM, se procesaron las mismas muestras con antígeno liofilizado obtenido del Centro de Referencia de OMSA producido por CIRAD (Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement, Montpellier, Francia) y cedido gentilmente por Marc Desquesnes (ver OE 5). También se realizó la validación del ensayo procesando sueros controles positivos cedidos por investigadores argentinos y brasileños.

Para cumplir con el **OE 3** se procesaron 578 bovinos remitidos al Laboratorio Regional Norte de DILAVE (Tacuarembó) utilizando el método de iELISA estandarizado.

Para evaluar la performance del protocolo con sueros equinos y la reactividad cruzada con *T. evansi* (**OE 4**) se procesaron muestras de equinos recolectadas en el marco de campaña de vigilancia de Surra, remitidos al Laboratorio Regional Norte y Laboratorio Central de DILAVE que resultaron positivos al ensayo de CATT/*T. evansi*.

Para el **OE 5**, se seleccionaron 42 sueros (bovinos y equinos) positivos y negativos para repetición de iELISA-*T. vivax* con dos antígenos: el producido para esta tesis y el antígeno de referencia de OMSA producido en el laboratorio de CIRAD. Las mismas muestras se procesaron paralelamente con iELISA-*T. evansi* (ELISA desarrollado en paralelo al iELISA-*T. vivax* pero utilizando como antígeno un extracto total de proteínas del aislado local de *T. evansi*). En esta comparación se incluyeron 24 sueros equinos con

resultado positivo del test de CATT-*T. evansi* realizado en el departamento de parasitología de DILAVE Central (gentilmente cedidos por el Dr. Ulises Cuore). Este objetivo surge posteriormente debido a la presencia de seropositividad a dicha prueba en equinos.

El **OE 6** se cumplió realizando un análisis geográfico para determinar seroprevalencia por departamento, además de estudiar posibles factores de riesgo o de mayor probabilidad de encontrar reacción a estos parásitos.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ENSAYO DE INOCULACIÓN

Para el protocolo experimental de inmunización se inoculó un bovino hembra de 2 años, de raza Braford, no preñada, de un rodeo sin antecedentes de enfermedades compatibles, con extracto de proteínas totales del parásito *T. vivax* cepa Y486. Este extracto corresponde a un lisado total de proteínas de parásitos aislados de ratones experimentalmente infectados (Protocolo CEUA Institut Pasteur de Montevideo N°: 004-17). Previo a la primera inoculación se extrajeron 10 mL de sangre por punción de vena yugular con el objetivo de obtener un suero preinmune, que se utilizó como control negativo.

La primera inmunización se realizó con 150 ug de extracto total de proteínas (“EP1”) en 1,5 mL (100 ug/mL) de Buffer Carbonato (pH 9,6) emulsionado en adyuvante oleoso completo (Freund) en relación 1:1. La dosis final de 3 mL se inyectó vía subcutánea en diferentes puntos del cuerpo del animal para potenciar la respuesta inmune. Se repitieron de manera similar, pero con adyuvante incompleto (de Freund) en las semanas 2, 4 y 6. Se extrajo sangre para monitoreo de anticuerpos (figura 8a). Para potenciar la producción de anticuerpos se aplicó un esquema similar de tres inoculaciones con un segundo extracto proteico (“EP2”) utilizando la misma concentración final, en el mismo animal (figura 8b). Se extrajeron un total de 14 sueros.

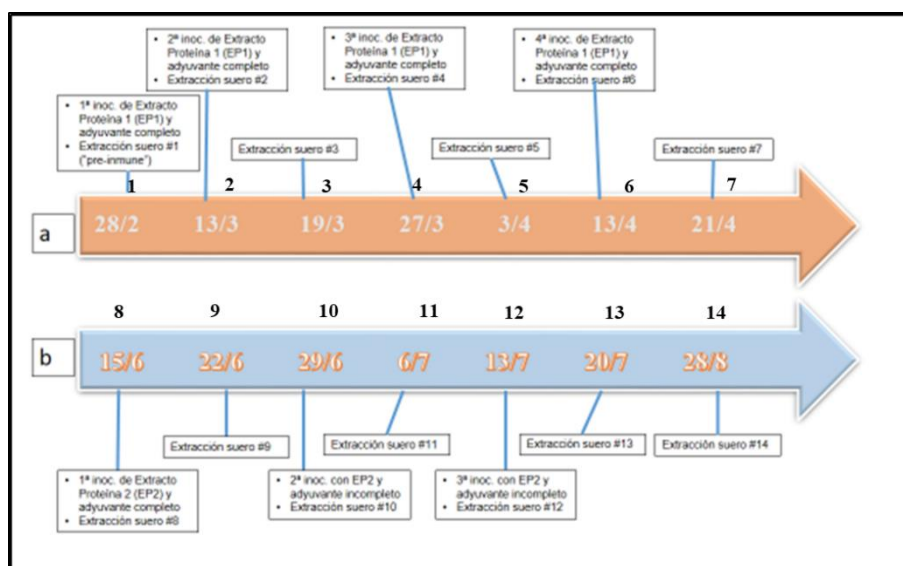


Figura 8, Línea de tiempo con las distintas instancias en el ensayo de inmunización. a) primer ciclo de inoculación con el primer extracto proteico. b) segundo ciclo de inmunización con el segundo extracto proteico. De este ensayo surge la denominación utilizada posteriormente para identificar estas muestras (1 al 14).

6.2 ANTÍGENOS UTILIZADOS

Para el desarrollo de un test de ELISA indirecto dirigido a detectar anticuerpos contra *T. vivax* en bovinos, se utilizó la cepa de *T. vivax* de referencia africana (*T. vivax* Y486), de ahora en adelante “IPM_Uy”, preparado según lo descrito por Greif et al. 2013.

Las concentraciones finales utilizadas fueron de 5 ug/mL diluidos con buffer carbonato-bicarbonato y las muestras de suero se utilizaron por duplicado en dilución 1/100 con PBS-leche 5%.

Para el desarrollo de un test de ELISA indirecto dirigido a detectar anticuerpos contra *T. evansi*, se utilizó como antígeno un extracto proteico total crudo de la cepa aislada en Uruguay (*T. evansi* “Vaimaca”), preparado de la misma manera que el extracto utilizado para el ELISA de *T. vivax*.

Por otra parte, como forma de validar el antígeno “IPM_Uy”, se realizó la comparación con el antígeno liofilizado obtenido de extracto total del asilado Magnan de Burkina Faso (2011) (Bossard et al. 2021) cedido por Marc Desquesnes del laboratorio de referencia para la OMSA de ATAOS (CIRAD). De ahora en adelante denominado “CIRAD”. Para el extracto liofilizado “CIRAD” la concentración final utilizada fue la misma (5 ug/mL, ya estandarizada previamente por el laboratorio de origen).

6.3 DESARROLLO DE UN ELISA INDIRECTO PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *T. vivax*

En base a un protocolo estándar de ELISA indirecto, varios experimentos fueron realizados para encontrar las condiciones más adecuadas como ser concentración final de antígeno “IPM_Uy”, dilución de los sueros, soluciones de buffer de bloqueo, anticuerpos secundarios para la detección, entre otros, con el objetivo de poner a punto el test.

Se sensibilizaron los pocillos de dos placas diferentes con 100 uL de antígeno (concentración final 5 ug/mL) y se dejaron overnight a 4°C para la adsorción del antígeno. Luego de esta sensibilización se procedió al bloqueo con 200 uL de PBS-leche al 5% y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente se lavaron tres veces con solución de lavado PBS-Tween20 0.05% y se procedió a colocar los 14 sueros obtenidos durante el ensayo de inmunización en dilución 1/100. Estos sueros se incubaron dos horas a 37°C, luego de lo cual se procedió a realizar cinco lavados con la misma solución de lavado. Posteriormente se agregaron 100 uL por pozo del anticuerpo de detección. El ensayo se

realizó con dos anti-anticuerpos secundarios: anti-IgG bovino-HRP y proteína G-HRP conjugada con enzima peroxidasa (Thermo) en una dilución 1/10000 con PBS-leche 5% incubando durante una hora a 37°C. Luego de siete lavados con solución de lavado se agregó 100 uL de sustrato para la enzima HRP. El sustrato se prepara inmediatamente antes de usar y consta de 25 mL de buffer fosfato- citrato pH 5 (25.7 mL 0.2M Na₂HPO₄, 24.3 mL 0.1M ácido cítrico, se lleva a 100 mL con agua destilada), una pastilla de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) y 10 uL H₂O₂. Luego de incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, se detiene la reacción con 50 uL de HCl 3M. La lectura de la absorbancia producida (densidad óptica, DO) se realizó por espectrofotómetro (AccurisTM Instruments SmartreaderTM 96) utilizando filtro de 492 nm. En el anexo III y IV se adjunta el protocolo final y las soluciones y reactivos utilizados.

Los resultados se expresaron en IDON (Índice de Densidad Óptica con respecto al control Negativo) que considera la DO promedio de las muestras problema en relación con el promedio de los controles negativos de cada placa. Cuando este resultado es mayor o igual a 1, la muestra se considera positiva.

6.4 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE ENSAYO iELISA- *T. vivax*.

Para evaluar la sensibilidad y especificidad se procesaron 33 sueros de bovinos positivos a *T. vivax* de Argentina (con confirmación parasitológica o mediante PCR) y siete sueros procesados previamente con valores de DO inferiores al suero pre-inmune de la vaca inmunizada y provenientes de la zona sur del país más el suero pre-inmune (ocho sueros negativos en total).

Luego de categorizar los sueros en Positivos (IDON $\geq$ 1) y Negativos (IDON $<$ 1), se realizó una tabla de contingencia con los datos de ambas categorías y a partir de la misma se calcularon los valores de: Sensibilidad, Especificidad, Precisión, Valor Predictivo Positivos (VPP), Valor Predictivo Negativo (VPN) y Exactitud.

6.5 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PROCESAMIENTO POR iELISA-*T. vivax*

Las muestras analizadas fueron remitidas al LRN entre los años 2018 y 2022 y consistieron en sueros congelados a -20°C hasta su procesamiento. Estas muestras provinieron de animales bovinos sin distinción de sexo, categoría o raza. El muestreo fue por conveniencia, para abarcar la región norte de Uruguay principalmente en la frontera

“seca” con Brasil. También se procesaron muestras que provinieron de animales con signos clínicos que pudieran asociarse a la tripanosomosis.

Las muestras fueron clasificadas según motivo de consulta o motivo de remisión en:

- Aborto y/o mortalidad perinatal u otro signo reproductivo
- Sospecha de Tristeza parasitaria
- Vigilancia bajo campaña de Brucelosis Bovina

Dentro de este último motivo el LRN recibe muestras de distintas zonas siendo los animales elegibles reproductores mayores al año de edad, en su mayoría hembras, sin distinción de raza.

Las muestras fueron recolectadas a partir de la vena yugular o coccígea en tubos sin anticoagulante. En el caso de las muestras de equinos, se remitieron en el marco de la campaña de Vigilancia de Surra Equina.

El total de las muestras procesadas se clasificaron según todas las variables mencionadas (fecha de extracción, departamento, motivo y especie).

El protocolo de iELISA-*T. vivax* utilizado ya fue descrito anteriormente. Se incorporaron como control negativo el suero pre-inmune por triplicado y como control positivo, los sueros obtenidos en el ensayo de inoculación por duplicado. Los sueros problema se evaluaron por duplicado para realizar los cálculos correspondientes.

Por último, se analizó la seroprevalencia según especie, departamento y motivo.

6.6 SELECCIÓN DE SUEROS PARA PROCESAR POR iELISA-*T. vivax* Y iELISA-*T. evansi*

Con el objetivo de evaluar reactividad cruzada entre *T. vivax* y *T. evansi*, se seleccionaron 18 sueros bovinos procesadas en iELISA-*T. vivax*: con valores de IDON negativos (n= 7) n°1-4 y 6-8) y positivos (n=11, n°5 y 9-18). Además, se seleccionaron 24 sueros equinos positivos a CATT-*T. evansi* y negativos previamente a ELISA con Ag *T. vivax* (n=13, Id 19-31) y positivos a CATT-*T. evansi* y positivos a iELISA-*T. vivax* (n=11, n° 32-42).

Estos sueros se procesaron junto al suero preinmune por triplicado y a dos sueros positivos por duplicado (vaca inmunizada del día 13/7 y del 20/7 obtenidos del ensayo de inoculación descrito en el ítem 6.1).

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los títulos de anticuerpos resultantes expresados en DO y su resultado en IDON se evaluaron con respecto al "cut off" ya mencionado en comparación con los sueros controles. Para el análisis de los resultados se utilizó el software de acceso libre R Studio utilizando las librerías "roc" y "ggplot2". Las gráficas de seroprevalencia en los mapas de Uruguay se realizaron considerando como sueros positivos los que resultaron con un IDON ≥ 1 . Se realizó t-test para comparación entre grupos.

7 RESULTADOS

7.1 ENSAYO DE INMUNIZACION PARA OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE ORIGEN BOVINO Y DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE UN PROTOCOLO DE ELISA INDIRECTO

Luego de realizado el protocolo de obtención de anticuerpos policlonales contra el extracto total de parásitos *T. vivax*, se realizó la evaluación de los sueros colectados mediante el ensayo de ELISA. Durante esta etapa se procedió a la estandarización del protocolo (adjunto al final del documento). En el ensayo, se incluyó el suero pre-inmune (día cero). Se realizó una placa para evaluar los sueros por duplicado, y sensibilizada con 3 diferentes antígenos: 1. el antígeno utilizado para inmunizar a la vaca, 2. antígeno anti-*T. vivax* producido en CIRAD proveniente del asilado Magnan de Burkina Faso (2011) (Bossard et al. 2021), 3. antígeno anti-*T. evansi* para evaluar reactividad cruzada. Los resultados de valores de DO para estas muestras se observan en el cuadro I, en las figuras 9 y 10.

De los datos puede observarse una señal de reconocimiento tanto al antígeno de inmunización, como al extracto producido por CIRAD a partir de la segunda semana de inmunización. La señal se mantiene al menos durante 2 meses, para luego disminuir. El pico observado al día 116 post-inoculación inicial (muestra 9), corresponde a la respuesta producida por el segundo ciclo de inmunización iniciado el 15 de junio (figura 10). Los valores de DO indican la presencia de anticuerpos al menos durante 50 días que se siguió el ensayo.

Por último, cuando los sueros fueron enfrentados al antígeno de *T. evansi*, se observó un incremento de la DO en los sueros post-inmunización frente al suero pre-inmune. Sin embargo, los valores observados tanto para el antígeno *T. vivax* de ambos orígenes (IPM_Uy y CIRAD) son significativamente superiores a los observados cuando los mismos sueros son enfrentados al antígeno de *T. evansi* resultando en valores de DO 5,46 veces superiores observados en los sueros frente al antígeno *T. vivax* vs el antígeno *T. evansi* (p-value 1,17E-10) y 4,03 veces superiores con el antígeno CIRAD vs *T. evansi* (p-value 1,2E-6). La diferencia de reactividad entre antígenos de *T. vivax* (IPM_Uy vs CIRAD) si bien menor (1,3 veces mayor contra antígeno IPM_Uy respecto a antígeno CIRAD) también es estadísticamente significativa (p-value =0,00002). Esta diferencia puede explicarse por la procedencia de las cepas a partir de la cual se realizaron los antígenos utilizados para el

ELISA. Como esperábamos, el antígeno utilizado para inmunizar y obtener el suero policlonal es el que produce mayor señal.

Cuadro I. Valores de Densidad óptica (DO) promedio de las muestras extraídas según días posteriores a la primera inoculación. Primer ciclo= muestra 1 a 7. Segundo ciclo= muestra 8-14

Identificación de la muestra	Fecha	Días post-inoculación inicial(dpi)	DO IPM_Uy	DO CIRAD	DO <i>T. evansi</i>
1	28/2/2020	0	0,433	0,28	0,132
2	13/3/2020	14 dpi	1,559	0,685	0,206
3	19/3/2020	20 dpi	1,64	0,814	0,275
4	27/3/2020	28 dpi	1,492	0,744	0,209
5	3/4/2020	36 dpi	1,305	0,824	0,208
6	13/4/2020	46 dpi	1,325	0,924	0,245
7	21/4/2020	54 dpi	1,294	0,974	0,288
8	15/6/2020	109 dpi	0,906	0,592	0,207
9	22/6/2020	116 dpi	1,595	1,285	0,266
10	29/6/2020	123 dpi	1,437	1,208	0,257
11	6/7/2020	130 dpi	1,835	1,636	0,381
12	13/7/2020	137 dpi	1,744	1,603	0,331
13	20/7/2020	144 dpi	1,864	1,812	0,406
14	28/8/2020	152 dpi	1,408	1,232	0,27

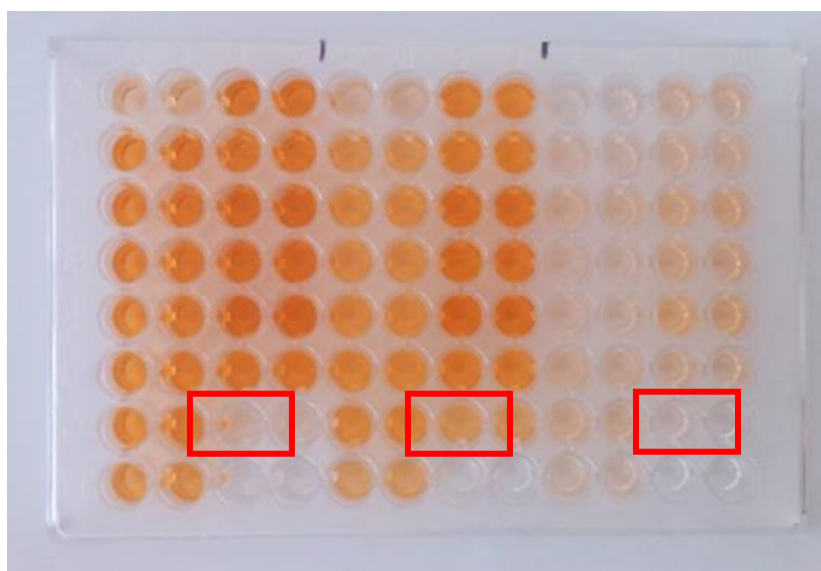


Figura 9. Foto de placa de ensayo de ELISA de sueros de la vaca inmunizada experimentalmente. Columnas 1-4= antígeno *T. vivax* IPM_Uy. Columnas 5-8= antígeno *T. vivax* CIRAD. Columnas 9-12= antígeno *T. evansi*. Obsérvese que la muestra de la fila G, pocillos 3, 4, 7, 8, 11 y 12 corresponden a un suero ovino positivo a *T. vivax* (recuadros rojos).

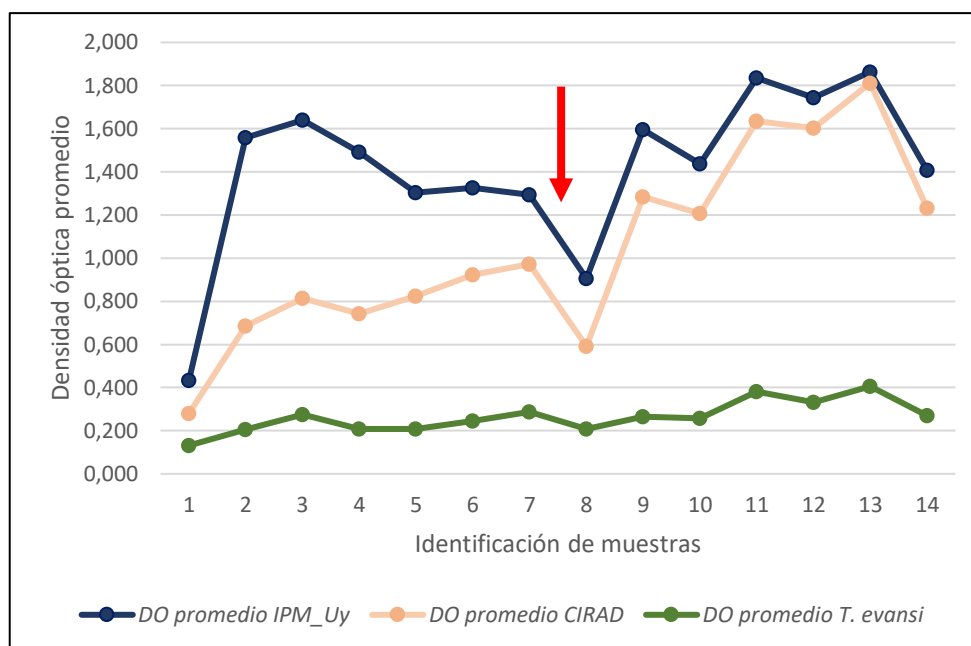


Figura 10. Densidad óptica (DO) promedio de duplicados (eje Y) para las 14 muestras obtenidas en el ensayo de inmunización (puntos en el eje X). La flecha indica el inicio del segundo ciclo de inoculación.

En suma, se produjeron exitosamente sueros controles positivos con buenos valores de DO para ser usados como controles en el desarrollo y utilización del test. El suero del día cero, identificado como suero 1, se denominará suero preinmune y será utilizado como suero negativo para los ensayos de ELISA. Los sueros de los días 6/7, 13/7 y 20/7 (identificados como 11, 12 y 13) se utilizarán como sueros controles positivos.

Como un test adicional de validación se probaron sueros positivos conocidos cedidos por investigadores externos. En este ensayo, un suero ovino positivo a *T. vivax*, produjo mayor señal cuando fue enfrentado con el antígeno *T. vivax* de CIRAD (DO= 0,621 vs 0,190 para el antígeno *T. vivax* IPM_Uy y 0,128 para el antígeno de *T. evansi*). Esto puede apreciarse a simple vista en la foto de la placa (figura 8, fila G, columnas 3, 4, 7, 8 y 11, 12). Este suero no fue tomado en cuenta para ensayos posteriores.

Sueros de origen bovino cedidos por investigadores brasileiros y comprobadamente positivos a *T. vivax* se enfrentaron a ambos antígenos de *T. vivax* con resultados satisfactorios. Debido al poco volumen recibido, no fue posible su uso en todas las placas realizadas.

7.2 DETERMINACIÓN DE PARAMETROS DE ENSAYO iELISA-*T. vivax*.

Para evaluar la sensibilidad y especificidad se procesaron 33 sueros de bovinos positivos a *T. vivax* de Argentina (con confirmación parasitológica o mediante PCR) y siete sueros procesados previamente con valores de DO inferiores al suero pre-inmune de la vaca inmunizada y provenientes de la zona sur del país, además del suero pre-inmune. Los resultados de DO e IDON (DO muestra/DO promedio sueros negativos + 3 desvíos estándar) para las muestras Positivas (P) y negativas (N) se observan en el boxplot de la Figura 11.

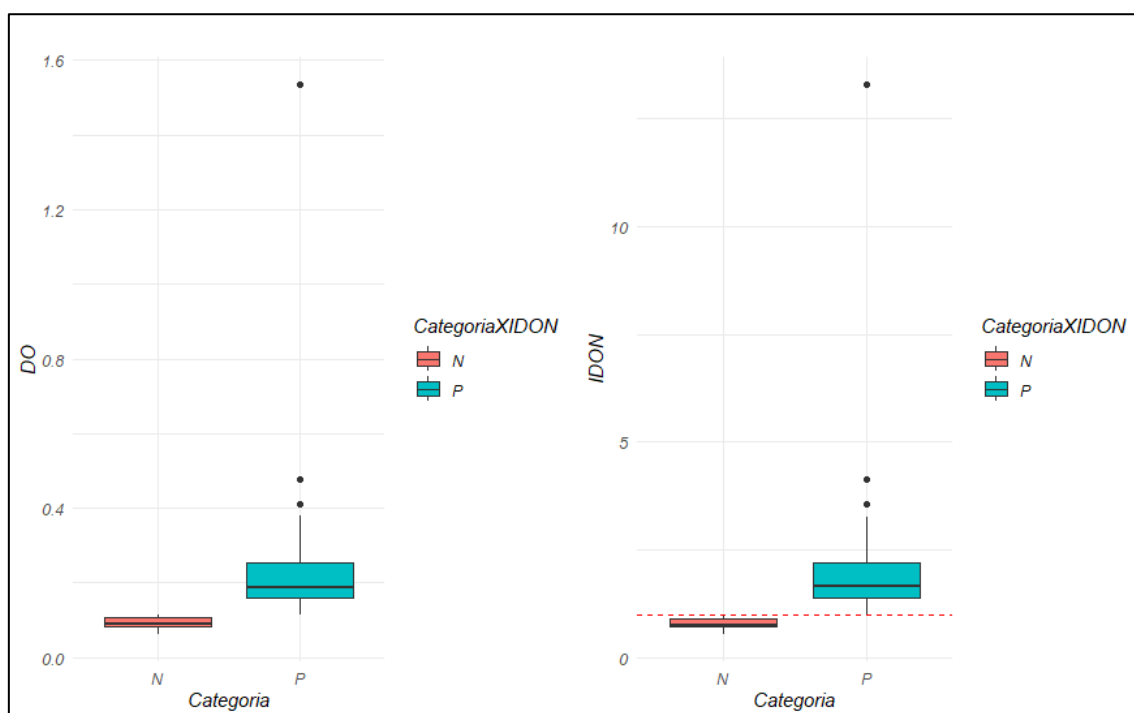


Figura 11. Boxplot mostrando valores de DO (izquierda) e IDON (derecha) por categoría de los sueros positivos y de los sueros negativos. La línea roja punteada indica el punto de corte de IDON=1.

Luego de categorizar los sueros en Positivos (IDON $\geq$ 1) y Negativos (IDON $<$ 1), se realizó una tabla de contingencia con los datos de ambas categorías y a partir de la misma se calcularon los valores de: Sensibilidad, Especificidad, Precisión, Valor predictivo positivos, Valor predictivo negativo y Exactitud. En el cuadro II se muestran los valores obtenidos para cada parámetro y las fórmulas utilizadas para calcularlo.

Cuadro II. Tabla de contingencia, fórmulas utilizadas para calcular los parámetros de la prueba.

Elisa/Datos	N Parasitológico	P Parasitológico	Total
N Elisa	8	3	11
P Elisa	0	30	30
Total	8	33	41

Elisa/Datos	N	P	Total
N	VN	FN	VN+ FN
P	FP	VP	FP+VP
Total	FP+ VN	FN + FP	Total

N= negativos, P= positivos, VN= verdaderos negativos, VP= verdaderos positivos, FN= falsos negativos, FP= falsos positivos

Sensibilidad	$VP/(VP+FN)$	0,91
Especificidad	$VN/(VN+FP)$	1
VPP o precisión	$VP / (VP + FP)$	1
VPN	$VN / (VN + FN)$	0,73
Exactitud	$(VP+VN)/Total$	0,93
Índice Kappa	$(Po-Pe)/(1-Pe)$	0,8
p-value	1,92x10E-7	
Proporción observada (Po)	$(VP+VN)/Total$	0,93
Proporción esperada (Pe)	$(PEP + PEN)$	0,64
Proporción Esperada Positivos	$(VP+FN)/Total \times (VP+FP)/Total$	0,59
Proporción Esperada Negativos	$(VN+FN)/Total \times (VN+FP)/Total$	0,05

De los datos obtenidos se observa una concordancia sustancial de acuerdo al valor Kappa (0,8) entre los resultados esperados y los determinados mediante el iELISA- *T. vivax*, utilizando un IDON $\geq$ 1 para categorizar las muestras como positivas. La especificidad fue del 100%, es decir que todas las muestras negativas fueron categorizadas de esa manera, y la sensibilidad del 91% indicando un 9% aproximado de falsos negativos. La precisión o valor predictivo positivo fue del 100% (es decir que todas las muestras categorizadas como positivas por el ensayo correspondían a sueros positivos), mientras que el valor predictivo negativo fue del 73%. Este bajo valor se debe en gran parte por el bajo número de sueros negativos utilizados, la presencia de tres sueros positivos catalogados como negativos explican esta proporción en el total de los ocho negativos. La exactitud presentó un valor superior al 90%.

7.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SUERO DE BOVINOS Y EQUINOS POR iELISA- *T. vivax*.

Se procesaron un total de 681 muestras (103 provenientes de equinos y 578 provenientes de bovinos) con distintos motivos de análisis: vigilancia en faena, exportación, animales con signos clínicos compatibles con tripanosomosis para diagnóstico laboratorial (bajo porcentaje de preñez, aborto, muerte perinatal, “tristeza”). En total se realizaron 17 placas de ELISA. De acuerdo a los datos obtenidos previamente, se utilizó el cálculo de $IDON \geq 1$ para categorizar los sueros positivos y < 1 para categorizarlos como negativos. En la Figura 12 se muestra un Boxplot con los valores de IDON para las muestras de Bovinos antes y después de la categorización como positivas o negativas según el IDON.

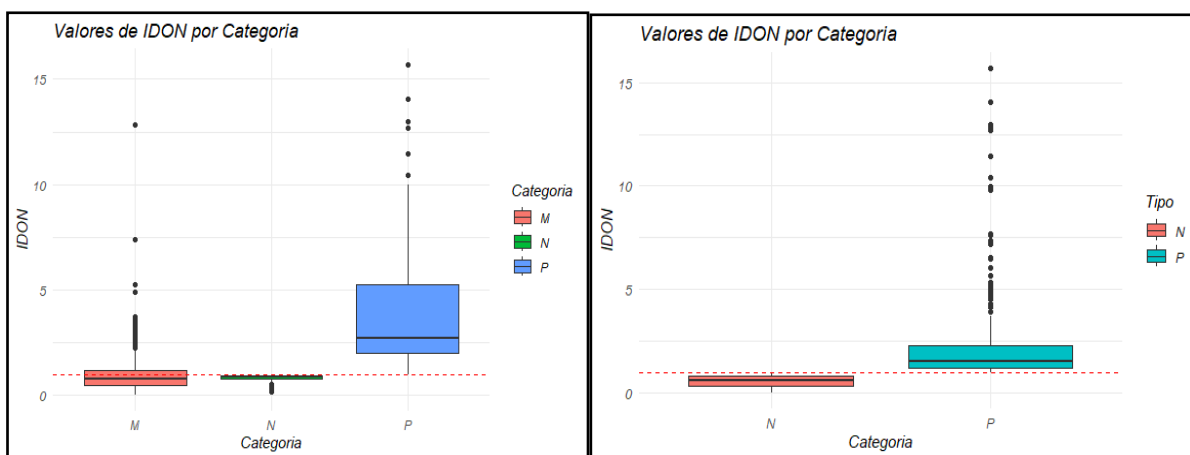


Figura 12. Boxplot de valores de IDON correspondientes a sueros bovinos. Izquierda: se muestran los valores de los sueros divididos en 3 categorías: Muestras (M), Controles Negativos (N) y Controles positivos (P). Derecha: luego de categorizar las muestras en positivas (P) o negativas (N) según el valor de IDON.

Como puede observarse en algunas muestras se obtuvieron valores de IDON similares a los observados en el suero control positivo (suero de vaca inmunizada experimentalmente con el antígeno homólogo donde se esperan títulos elevados), indicando que esos sueros provienen de bovinos con infección reciente o con una respuesta inmune elevada contra *T. vivax*.

La seroprevalencia general alcanzada fue en el caso de los bovinos **32,17%** (186 muestras de un total de 578) y en equinos **41,74%** (43 sueros positivos de 103 sueros).

7.3.1 Seroprevalencia para ensayo iELISA- *T. vivax* según motivo de consulta

Si evaluamos la seroprevalencia en el total de sueros bovinos que incluyeron el dato de motivo de consulta (n: 566), encontramos porcentajes de positividad que varían desde el 23% al 40% (cuadro III y figura 13). El motivo de consulta, aunque con poca cantidad de muestras, que presenta mayor seropositividad refiere a casos de pérdida perinatal (40%). Otros motivos de consulta referidos a problemas reproductivos (aborto, y/o bajo porcentaje de preñez) presentan valores de positividad mayores al 30%. Estos porcentajes mayores del 30 % sugieren una probable incidencia de la tripanosomosis en los problemas reproductivos. Es importante hacer notar que la mayoría de estos casos no tuvieron otros posibles diagnósticos confirmados que pudieran explicar los problemas reproductivos (datos no mostrados). El motivo de consulta con menor seroprevalencia fue el de tristeza (23%). Si bien es el porcentaje más bajo, igualmente indica que existieron sueros reaccionantes positivos y que estos parásitos pueden haber estado presente en algún momento de la vida del animal, coexistiendo con otros agentes causantes de tristeza bovina.

En el caso de equinos los porcentajes varían del 0 al 60% de seroprevalencia correspondiendo a tres motivos de remisión al laboratorio (tristeza, vigilancia y aborto). Las muestras provenientes de animales con signos clínicos fueron nueve, las muestras de vigilancia analizadas fueron 94, mientras que las muestras provenientes de aborto fueron 5. En el motivo registrado como aborto no se obtuvieron sueros positivos en este ensayo.

Estos datos demuestran la utilidad del relevamiento serológico en animales en situaciones diversas (clínicamente sanos o enfermos) como forma de realizar un estudio de situación epidemiológica mediante la búsqueda de anticuerpos.

Cuadro III. Cantidad de muestras procesadas de bovinos y equinos según motivo de consulta.

Motivo de Consulta	Positivos	Negativos	Total	%Positivos
Bovinos				
Pérdida Perinatal*	16	24	40	40
Bajo Porcentaje Preñez	14	27	41	34
Faena	26	52	78	33
Aborto	99	209	308	32
Aborto y Mortalidad Perinatal	4	10	14	29
Aborto y Tristeza	8	22	30	27
Tristeza	13	43	56	23
Total	180	386	566	32%
Equinos				
Tristeza	3	2	5	60
Vigilancia	40	54	94	43

Aborto	0	4	4	0
Total	43	60	103	42%

* *pérdida perinatal incluye motivos registrados como "mortinato", "mortalidad perinatal", "pérdida neonatal"*

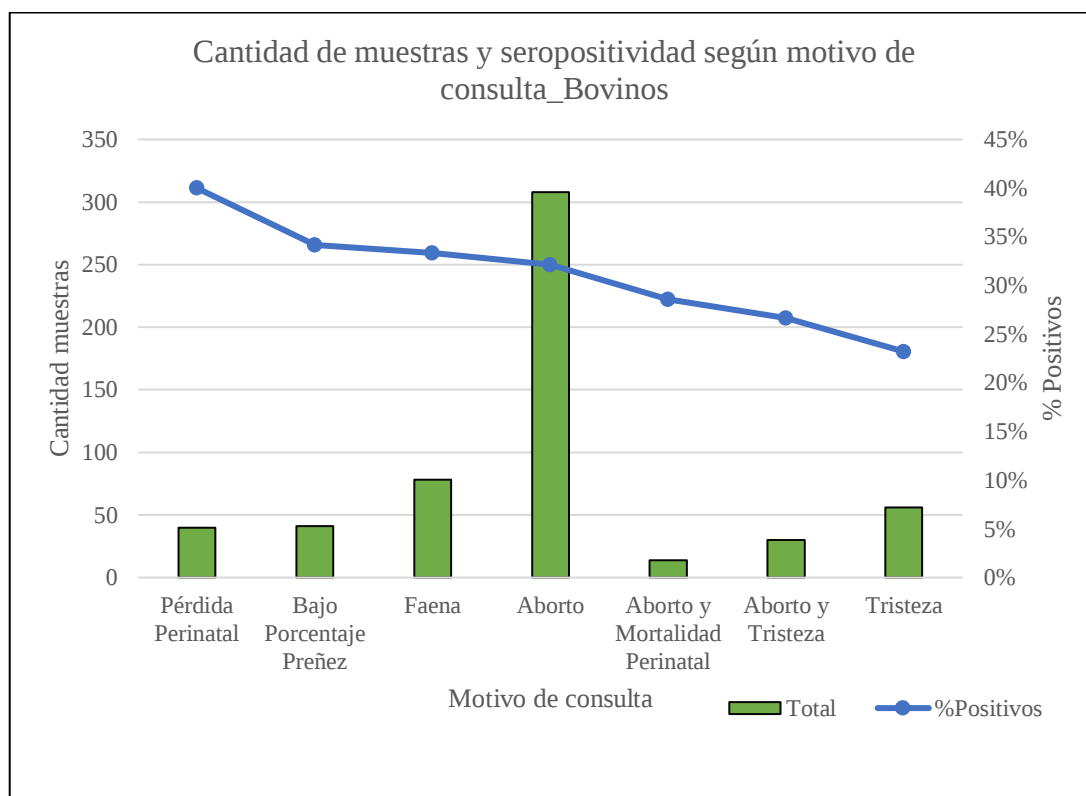


Figura 13 Seroprevalencia general según motivo de consulta. Las barras indican número de casos (eje izquierdo), mientras que los puntos indican para cada categoría el porcentaje de positividad obtenido en el iElisa-*T.vivax* (eje derecho).

7.3.2 Seroprevalencia para ensayo iELISA- *T. vivax* según departamento

La cantidad de muestras, discriminados por departamento y que incluían dicha información fueron 573 muestras de bovinos y 94 de equinos. Los resultados negativos y positivos considerando el título de corte de IDON $\geq$ 1 se muestran en los cuadros IV y V, mientras que en la figura 14 se representa la prevalencia según departamento. En el caso de bovinos, los departamentos ubicados en la región noroeste, limítrofes con Brasil y/o Argentina, presentan una seroprevalencia mayor al 30% (Salto, Paysandú y Artigas). Esto cumple con la hipótesis de encontrar mayor seroprevalencia en los departamentos fronterizos, y por ende enfocar la vigilancia y la investigación de tripanosomosis animales en dicha región. Sin embargo, deberán tomarse más cantidad de muestras en la región sur del país para confirmar la hipótesis planteada.

Cuadro IV. Sueros analizados de bovinos discriminados por departamento

Departamento	Negativos	Positivos	Total	Seroprevalencia
Salto	24	25	49	51%
Paysandú	34	19	53	36%
Artigas	19	10	29	34%
Durazno	2	1	3	33%
Tacuarembó	213	97	310	31%
Cerro Largo	33	12	45	27%
Rivera	63	21	84	25%
Total	388	185	573	32%

La situación en el caso de equinos es similar con seroprevalencias variables (0 al 83%), aunque mayor en los departamentos de Treinta y Tres, Cerro Largo, y Tacuarembó. En el primer caso, el alto nivel de seropositividad podría representar un nicho de presencia de *Trypanosoma* spp., ya que corresponden a animales del mismo establecimiento, encontrando 10 de 12 sueros clasificados como positivos utilizando el iELISA-*T. vivax*.

Cuadro V. Sueros analizados de equinos discriminados por departamento.

Departamento	Negativos	Positivos	Total	Seroprevalencia (%)
Treinta y Tres	2	10	12	83%
Cerro Largo	3	4	7	57%
Tacuarembó	3	2	5	40%
Artigas	25	14	39	36%
Rivera	17	8	25	32%
Paysandú	4	1	5	20%
Florida	1	0	1	0%
Total	55	39	94	41%

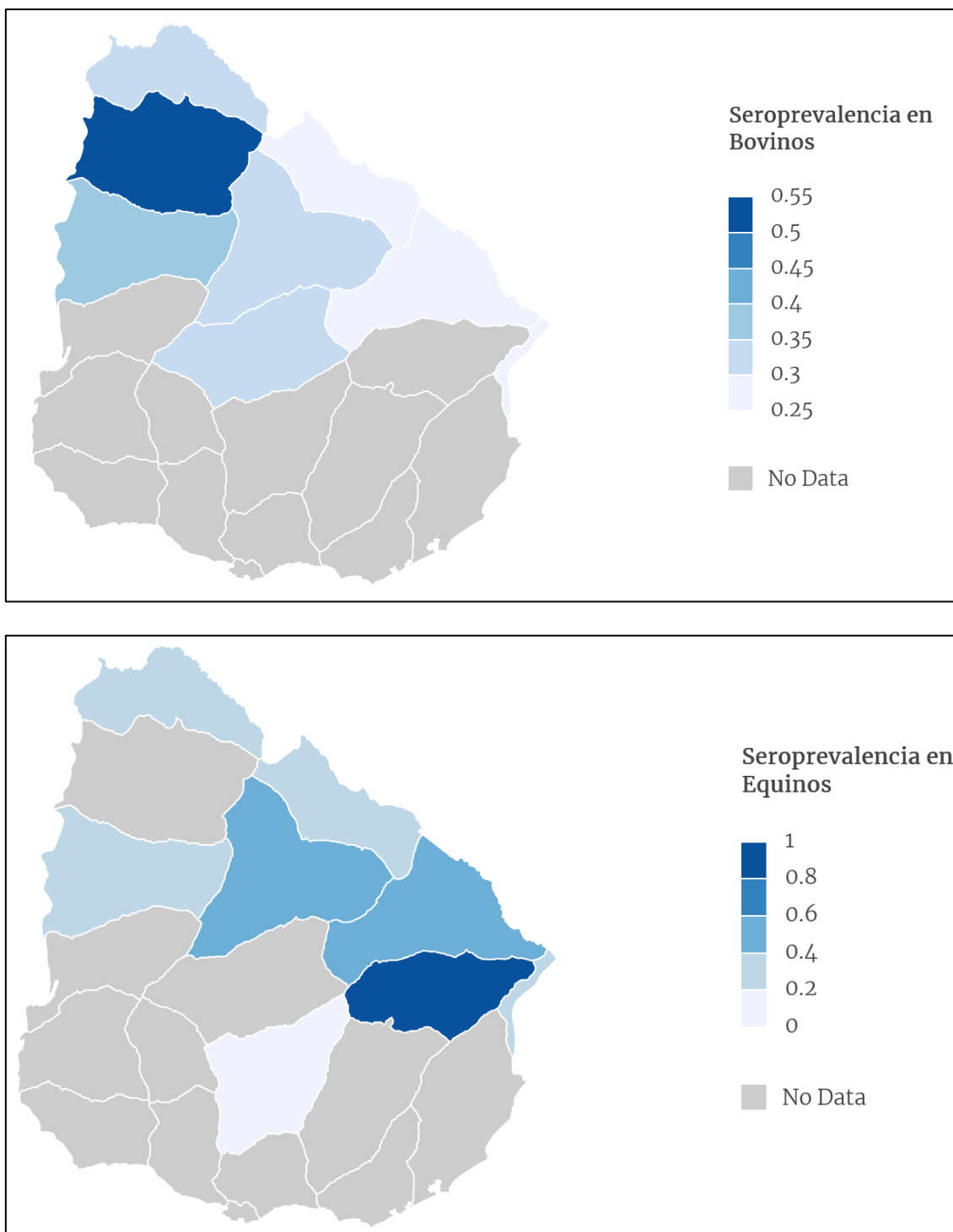


Figura 14. Se representa la seroprevalencia por departamento discriminada para bovinos (A), equinos (B).

7.4 PUESTA A PUNTO DE iELISA-*T. evansi* Y COMPARACIÓN CON iELISA-*T.*

vivax

Luego de procesar las muestras (ver 7.3), se seleccionaron 42 sueros (18 de bovinos y 24 de equinos) se pasó a la siguiente etapa que consistió en procesarlos junto a los sueros

controles en 2 sistemas de ELISA como se describe en materiales y métodos (ítem 6). Por un lado, nos interesaba determinar si la señal detectada en equinos utilizando el iELISA-*T. vivax*, se correspondía en realidad a reacciones cruzadas con *T. evansi*, para lo cual se decidió obtener un iELISA-*T. evansi*, sensibilizando placas con extracto total de parásitos del aislado local de *T. evansi* obtenido en el laboratorio IPM en 2018. Del mismo modo, nos interesaba determinar en el caso de bovinos positivos frente al antígeno de *T. vivax*, también reaccionarían en una ELISA con antígeno de *T. evansi*.

A continuación, analizaremos los resultados de los controles y de las 42 muestras.

7.4.1 Sueros controles

Los resultados de DO de los sueros controles utilizados se muestran en el cuadro VI y en la figura 15. La DO promedio del suero preinmune utilizado como control negativo se encuentra por debajo de 1,00 en los 2 sistemas (0,882 y 0,293).

Cuadro VI. Resultados de DO promedio obtenidos para los sueros controles (suero preinmune por triplicado, dos sueros positivos por duplicado) para las 2 placas realizadas.

	iELISA- <i>T. vivax</i>	iELISA- <i>T. evansi</i>
Suero preinmune	0,882	0,293
Controles positivos	3,149	0,599

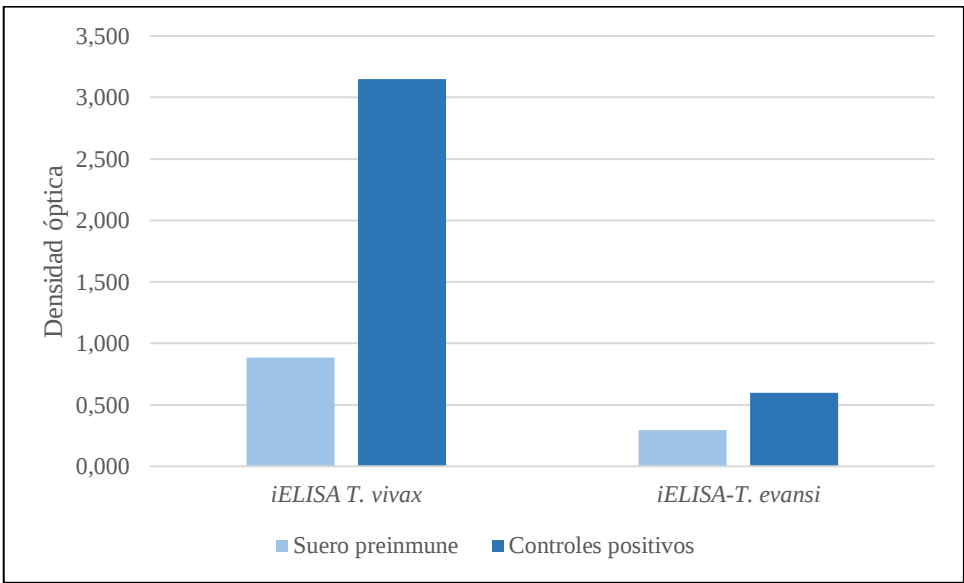


Figura 15. Valores de DO de los sueros utilizados como control negativo (suero preinmune) y controles positivos (de vaca inmunizada del día 13/7 y 20/7) en los dos sistemas evaluados.

De la misma manera ocurre con la DO promedio de los controles positivos (3,149 y 0,599) cuyo IDON resultó > 1 en ambos casos (3 y 1,9). En el caso de la DO de los

controles positivos, el resultado es esperable al ser el segundo sistema heterólogo, es decir que la placa fue sensibilizada con un antígeno distinto (antígeno de *T. evansi* enfrentado a sueros anti-*T. vivax*). Sin embargo, es llamativo que la señal del suero pre-inmune sea mayor en el sistema homólogo que en el heterólogo. Esta señal aumentada en el suero preinmune frente al antígeno de *T. vivax*, podría deberse a un problema durante la sensibilización o el bloqueo que permitieron un pegado inespecífico de anticuerpos. Una segunda opción que podría explicar este resultado sería que la vaca inmunizada haya estado previamente enfrentada a *T. vivax* y tuviera un título de anticuerpos frente al parásito que, aunque bajo, puede estar dando una señal. Esta opción nos parece poco probable debido al origen y control de la vaca utilizada para este ensayo, pero no lo podemos descartar con estos datos.

7.4.2 Resultados de muestras de bovinos y equinos

En el siguiente cuadro (cuadro VII) se visualizan los valores de DO promedio y los valores de IDON de los 42 sueros para las dos placas descritas anteriormente (iELISA-*T. vivax* y iELISA-*T. evansi*). Los sueros seleccionados por resultar positivos en iELISA-*T. vivax* previamente, se muestran en negrita.

Cuadro VII. DO promedio e IDON de las muestras seleccionadas de bovinos y equinos para cada sistema de ELISA.

	Nº muestra	iELISA- <i>T. vivax</i>		iELISA- <i>T. evansi</i>	
		DO	IDON	DO	IDON
Bovinos	1	0,154	0,147	0,173	0,575
	2	0,195	0,186	0,204	0,678
	3	0,258	0,246	0,244	0,811
	4	0,179	0,171	0,198	0,658
	5	1,575	1,500	0,265	0,881
	6	0,227	0,216	0,290	0,964
	7	0,170	0,162	0,148	0,492
	8	0,297	0,283	0,209	0,694
	9	0,484	0,461	0,183	0,608
	10	1,865	1,777	0,193	0,641
	11	2,129	2,028	0,255	0,847
	12	2,298	2,189	0,374	1,243
	13	1,552	1,478	0,587	1,951
	14	2,071	1,973	0,190	0,631
	15	2,643	2,518	0,252	0,837
	16	1,703	1,622	0,330	1,097
	17	1,703	1,622	0,294	0,977
	18	1,241	1,182	0,214	0,711

Equinos	19	0,280	0,267	0,126	0,419
	20	0,137	0,131	0,197	0,655
	21	0,137	0,131	0,140	0,465
	22	0,235	0,224	0,215	0,714
	23	0,098	0,093	0,106	0,352
	24	0,115	0,110	0,109	0,362
	25	0,131	0,125	0,121	0,402
	26	0,123	0,117	0,121	0,402
	27	0,151	0,144	0,129	0,429
	28	0,092	0,088	0,090	0,299
	29	0,162	0,154	0,178	0,591
	30	0,191	0,182	0,287	0,954
	31	0,101	0,096	0,118	0,392
	32	0,097	0,092	0,099	0,329
	33	0,113	0,108	0,156	0,518
	34	0,677	0,645	2,411	8,012
	35	0,128	0,122	0,129	0,429
	36	0,144	0,137	0,180	0,598
	37	0,329	0,313	0,750	2,492
	38	0,163	0,155	0,304	1,010
	39	0,241	0,230	0,264	0,877
	40	0,349	0,332	0,767	2,549
	41	0,649	0,618	2,356	7,829
	42	0,156	0,149	0,123	0,409

En las figuras 16 se grafican los valores resultantes de IDON de las muestras según especie y clasificados en positivos y negativos para los dos sistemas, mientras que en el gráfico siguiente (figura 17) se representa la relación entre los resultados.

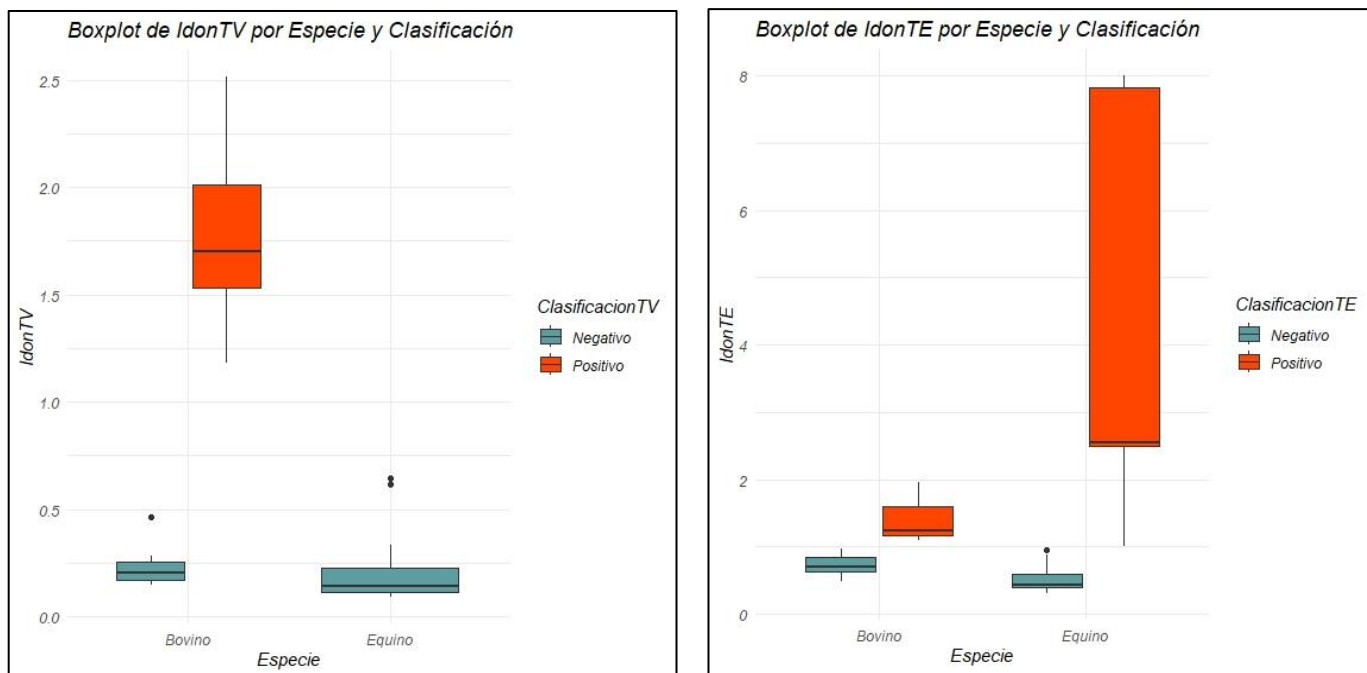


Figura 16. Boxplot representando el IDON según especie en los dos sistemas: iELISA- *T. vivax* (TV) a la izquierda y iELISA- *T. evansi* (TE) a la derecha. En verde se muestran los sueros clasificados como negativos y en naranja los sueros clasificados como positivos.

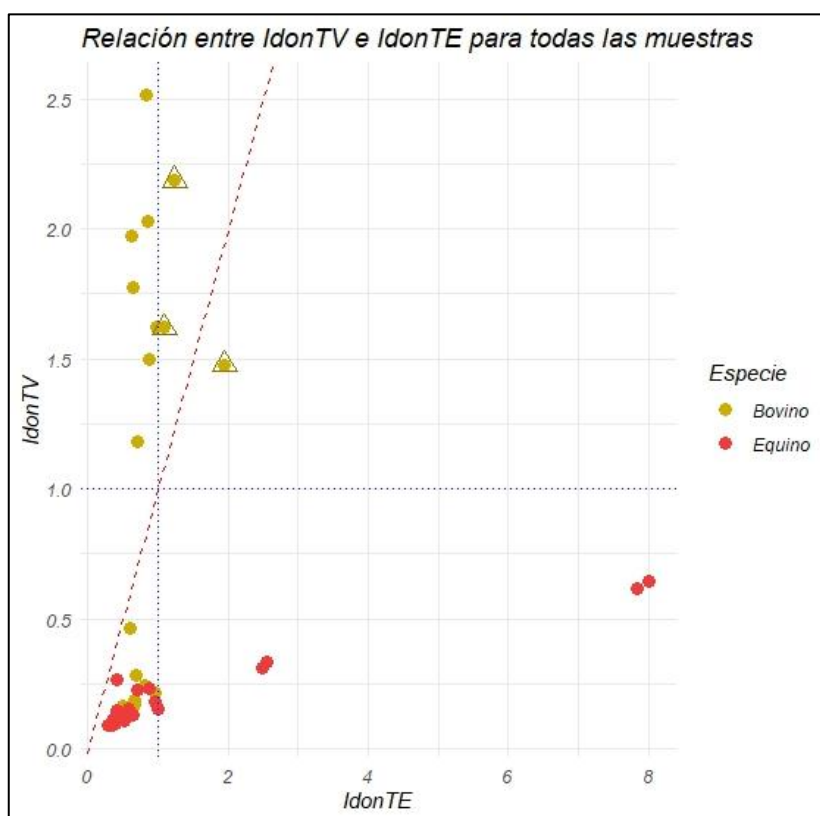


Figura 17 Gráfico de dispersión mostrando la relación entre IDON en iELISA-TV e IDON iELISA-TE para bovinos en amarillo y equinos en rojo. Las líneas punteadas muestran los cut off de IDON.

Al analizar los valores de IDON de cada muestra de bovinos se observan algunos datos interesantes. Las muestras de los sueros nº12, 13 y 16 (representadas con triángulos en la figura 17), resultaron positivas a ambos sistemas. Si realizamos el "ratio" de IDON para los dos sistemas (relación IDON iELISA- TV/IDON iELISA- TE) podemos evidenciar que en las muestras 12 y 16 (triángulos a la izquierda de la línea diagonal) obtenemos un "ratio" > 1 indicando una señal mayor para iELISA-TV(1,8 y 1,5 respectivamente), contrario a lo observado en la muestra nº13 (triángulo a la derecha) con un ratio de 0,76. Esto puede sugerir la existencia de reacción cruzada en estas muestras con mayor especificidad para los animales 12 y 16 para *T. vivax* y en el animal 13 para *T. evansi*. La muestra nº 9 catalogada previamente como positiva (IDON $\geq$ 1) a iELISA-*T. vivax*, resultó negativa en este ensayo. Esta variación puede explicarse por un nivel de reacción positiva leve, muestras denominadas como “zona gris” o “borderline” mencionadas en la bibliografía para este tipo de ensayos.

En cuanto a los sueros equinos debemos aclarar que los cálculos de IDON se realizaron con los mismos sueros controles anteriores (bovinos) mostrando valores de DO menores a los esperados si se utilizara un suero homólogo al sistema. De los 11 sueros catalogados positivos previamente por iELISA-*T. vivax*, 5 resultaron positivos al sistema iELISA-*T. evansi*, con ratios *T. vivax*/*T. evansi* < 1 (muestras en el cuadrante derecho inferior), siendo altamente probable que anticuerpos contra *T. evansi* sean los causantes de la reacción positiva previa.

En este ensayo, las muestras de equinos no resultaron positivas al sistema de iELISA-*T. vivax*, cómo sí lo habían resultado previamente.

8 DISCUSION

Las enfermedades causadas por tripanosomas afectan varias especies y son provocadas por diversos tripanosomatidos. Diagnosticar la presencia del parásito en los bovinos y equinos, se ve dificultado por la variedad de signos clínicos que no son patognomónicos y pueden confundirse con otras patologías. Además, la posibilidad de que coexistan distintos agentes en la misma región, en el mismo rodeo e incluso en el mismo animal, es otra limitante importante en la detección de la enfermedad.

El desarrollo de un protocolo estandarizado y validado de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*T. vivax* y anti-*T. evansi*, debido a la falta de kits completos comerciales y validados en nuestras condiciones a nivel de campo, es un paso importante para el apoyo a la vigilancia de la enfermedad, teniendo en cuenta que Uruguay no tiene todavía reportada la presencia de *T. vivax* en bovinos, y en equinos se ha notificado *T. evansi* mediante el test de CATT con un alto número de falsos positivos.

La inmunización experimental en animales es una herramienta válida para la obtención de sueros controles que contengan anticuerpos policlonales cuándo no se puede acceder a controles de referencia (OMSA 2014). En esta investigación los valores de DO indican la presencia de anticuerpos al menos durante 50 días que se siguió el ensayo. Esto concuerda con lo estudiado recientemente por de Melo-Junior et al. (2024) quienes evidenciaron el mantenimiento del título de anticuerpos durante al menos 2 años post-infección con cepas vivas.

Hay tres reactivos críticos para el desarrollo de un test de ELISA: el antígeno para la sensibilización, los sueros controles negativos y los sueros controles positivos y la obtención de sueros previamente confirmados positivos y negativos para la evaluación de la capacidad diagnóstica del ensayo. La posibilidad de obtener estos reactivos localmente es un paso fundamental para poder aplicar esta prueba en el país, además de obtener ensayos que detecten las variantes circulantes en el continente.

La performance del test de ELISA desarrollado en este trabajo fue evaluada con sueros positivos cedidos por investigadores extranjeros y sueros negativos, mostrando valores muy aceptables de especificidad y sensibilidad diagnóstica (100% y 91% respectivamente), mientras que la precisión (o valor predictivo positivo, VPP) fue del 100% indicando que todas las muestras categorizadas como positivas correspondían a sueros realmente positivos. El valor predictivo negativo (VPN) fue más bajo (73%) lo que se puede

explicar por los pocos sueros reales negativos para estudiar (8 sueros). La especificidad del 100% concuerda con otros autores que encontraron especificidad mayor al 92% con metodologías similares. El valor de sensibilidad concuerda con otras investigaciones en las cuales se encontraron porcentajes de 89,6%, 90% y 97,6% (Madruga et al. 2006, Tamasuskas et al. 2017, Bontempi et al. 2024). El VPN bajo podría mejorarse aumentando la cantidad de muestras realmente negativas.

La comparación con otras investigaciones de los **valores crudos de DO** de controles negativos y positivos, se dificulta al carecer de un proceso normalizado para comparar los resultados, por esto se utilizó la interpretación y categorización mediante un índice con respecto a los controles negativos (**IDON**) (Vicco et al. 2013, Bontempi et al. 2024). Otra relación que se ha propuesto es el Porcentaje Relativo de Positividad (PRP) (Wright et al. 1993, Monzón et al. 2000, Madruga et al. 2006, Bossard et al. 2021).

El test de ELISA indirecto es ampliamente utilizado para la **evaluación serológica y vigilancia** ya que permite procesar gran cantidad de muestras con relativo bajo costo de equipamiento y reactivos, capacitación media de los operadores, y accesibilidad del tipo de matriz utilizada (suero sanguíneo). Estas ventajas sobre otras técnicas, la hace de uso frecuente para estos tipos de estudios (Ferenc et al. 1990, Madruga et al. 2006, Tamasaukas et al. 2017, Maldonado et al. 2024, Bontempi et al. 2024). En este trabajo se pudieron procesar un total de 681 muestras de campo en poco tiempo.

El principal obstáculo en el transcurso de esta tesis fue contar con sueros de referencia para poder calcular los parámetros diagnósticos del ensayo puesto a punto. Sin embargo, una vez que se establecen las condiciones y se obtienen los reactivos y los sueros de referencia el procesamiento es sencillo y posibilita el análisis de 40-42 muestras de suero por duplicado en una misma placa.

En este trabajo surgen resultados positivos de muestras de equinos utilizando el ensayo de ELISA con el antígeno de *T. vivax*. La posibilidad de resultados **falsos positivos** para *T. vivax* podrían deberse a la **reacción cruzada** con otras especies de tripanosomas por lo cual la especificidad tiende a disminuir en zonas donde otros parásitos de esta familia se encuentran presentes. También se han descrito a los bovinos como portadores asintomáticos o sintomáticos de *T. evansi* y *T. theileri* (Desquesnes 1997, Herrera et al 2004, Osório et al. 2008, Sood et al. 2011, Silva et al. 2018). Por otra parte, existen reportes de *T. vivax* infectando naturalmente a equinos (Silva et al. 2011, Desquesnes et al. 2013). Incluso se ha propuesto el uso de antígeno de *T. evansi* o *T. equiperdum* para detectar *T. vivax* en sistemas

heterólogos (Uzcanga et al. 2016, Maldonado et al. 2024). En la investigación de Desquesnes et al. (2001a), se evaluaron las reacciones cruzadas llegando a la conclusión que la intensidad de la unión antígeno-anticuerpo en un sistema homólogo es siempre mayor respecto al sistema heterólogo, aumentando la especificidad de especie del diagnóstico. Estos investigadores también describieron que la aparición de falsos positivos podría deberse a dos causas: que los anticuerpos que predominan en infecciones tempranas son específicos para género, pero no específicos de especie, y que existiría interferencia entre IgM e IgG en las infecciones tempranas, incrementándose la avidez en infecciones más tardías.

En el segundo ensayo, las muestras de equinos no resultaron positivas al sistema de iELISA-*T. vivax*, cómo sí lo habían resultado previamente, lo que podría deberse a la disminución de la afinidad en el tiempo entre anticuerpos anti-*T. evansi* para unirse a antígeno *T. vivax*. Otro factor que podría afectar esta unión podrían ser ciclos de congelación/descongelación de los sueros que pudieran disminuir la viabilidad de los anticuerpos.

En cuanto a la **seroprevalencia** en bovinos detectada en esta investigación, concuerda con estudios realizados en la región. En la región central de Argentina, Bontempi et al. (2024) encontraron una seroprevalencia del 53% con variaciones del 21 al 69% dependiendo de la zona. Estos investigadores evaluaron 892 muestras de bovinos de campo mediante Ac-ELISA con una combinación de dos antígenos recombinantes de *T. vivax*. Mientras que en el sur de Brasil (2023) y en Ecuador (2024) se encontraron seroprevalencias de 24,6% y 19,1% (Samoel et al. 2023 Maldonado et al. 2024).

Aunque el muestreo fue de conveniencia y no probabilístico, debido a insumos limitados, también se procesaron muestras elegidas al azar. Dentro de las muestras de bovinos remitidas con **motivo** de diagnóstico de alguna enfermedad o problema (tristeza o signos reproductivos), el porcentaje obtenido de reaccionantes positivos fue de 27% (154 positivas de 566 muestras). Los motivos de remisión relacionados con alguna falla reproductiva significaron un 80% del total de los sueros positivos en bovinos (145/180). Esto concuerda con varios reportes de brotes en los cuales se describen como una de las manifestaciones principales el aborto o la muerte perinatal, considerando a la Tripanosomosis como una enfermedad reproductiva de pérdidas económicas importantes (Seidl et al. 1999, Abrão et al. 2009, Bezerra y Batista 2008, Galiza et al 2011, Abdala et al 2020, Batista et al. 2022). La patogenia del aborto o la muerte perinatal no es bien conocida, aunque se sugirieron experimentalmente varias vías cómo ser la afectación materna (estrés,

hipertermia, anemia, cambios hormonales), así como la invasión e injuria directa a la placenta y al feto (Silva et al. 2013).

En cuanto a las muestras procesadas con motivo de vigilancia epidemiológica en faena en el marco de la campaña de brucelosis bovina y elegidas en base a la ubicación del predio (departamentos limítrofes con Brasil), de un total de 78 muestras resultaron 26 positivas (33%). De todas las muestras de bovinos procesadas, las remitidas por este motivo fueron las únicas seleccionadas en base a su ubicación geográfica. Esto se debió al planteo inicial de realizar un muestreo dirigido a departamentos de frontera y a épocas con mayor abundancia de tábanos, así como periodos post vacunación contra fiebre aftosa. Al contar con insumos limitados se seleccionaron al azar una cantidad mínima de muestras a procesar correspondientes a este motivo. Sin embargo, puede apreciarse que existen sueros reaccionantes positivos, sugiriendo que estos parásitos estuvieron presentes en algún momento de la vida del animal, probablemente de manera inaparente. En este contexto, Bolívar et al. (2006) reporta la presencia de infecciones subclínicas causadas por *T. vivax* en bovinos aparentemente sanos, pudiendo actuar como portadores y reservorios de la enfermedad.

La seroprevalencia fue variable según **departamento** destacándose en bovinos el departamento de Salto (litoral oeste) con mayor porcentaje. Este departamento está ubicado en la región noroeste del país, considerada de ganadería extensiva. Esto podría implicar una mayor prevalencia de la infección debido a menos control de los animales, más interacción con vectores o con animales silvestres, en contraparte de manejos más intensivos (Maldonado et al. 2024).

La posible explicación de sueros positivos en zonas más alejadas de los departamentos limítrofes de Brasil o Argentina, podría ser primero, la movilidad de animales que pudiendo ser portadores inaparentes transmitan el parásito y no presenten la enfermedad como ya fue mencionado. Segundo, la posibilidad de que existan reservorios no bovinos que puedan transmitir alguna especie de tripanosoma y que puedan movilizarse más que los dípteros hematófagos (Silva 2006). Sin embargo, debido a que la procedencia de las muestras por departamento no fue uniforme no debemos tomar estos datos como definitivos. Si bien se priorizó tener sueros de animales provenientes de departamentos limítrofes, dónde esperábamos encontrar animales positivos, solamente se pudo lograr con las muestras de faena. Las muestras remitidas al laboratorio por otros motivos (la gran mayoría de las muestras procesadas), son en su mayoría provenientes del centro del país.

En cuanto a los **métodos directos de diagnóstico**, aunque sean referidos como **"gold standard"** son pobres en cuanto a su sensibilidad y especificidad. Incluso la detección de ADN tiene sus ventajas y desventajas dentro de las técnicas moleculares, no habiendo un protocolo único recomendado para el diagnóstico específico de subgénero, cepa o tipo (Desquesnes et al. 2022a). Se reporta que lo mejor es la realización de una PCR de screening y luego otra monoespecífica. Esto significa además el aumento en los tiempos y los costos del procesamiento, no haciendo factible el uso rutinario para diagnóstico, menos aún con objetivos de vigilancia en rodeos. En el transcurso de esta tesis se procesaron varias muestras mediante PCR convencional con primers dirigidos al ITS1 no arrojando resultados positivos (datos no mostrados).

Uno de los **factores de riesgo** asociados a la alta prevalencia en Brasil se debe al uso de oxitocina como práctica habitual para aumentar la producción de leche, por ende, aumenta la prevalencia de tripanosomosis en hembras de razas lecheras (Madruga 2004, Silva 2006, Batista et al. 2018). En este estudio encontramos más del 30% de bovinos reaccionantes positivos, aunque no se realizó distinción de raza o categoría. Sin embargo, podemos asumir según el motivo de remisión y la localización de los establecimientos, que la mayoría de las muestras corresponden a hembras en etapa reproductiva y a razas carniceras. Las épocas más propensas a encontrar tripanosomas en animales, están asociadas a la probabilidad de encontrar mayor población de vectores mecánicos animados, pero también podría estar relacionada a campañas de vacunación masiva. Algunos autores indican que en rodeos lecheros existe mayor probabilidad de presentar la enfermedad por contacto más estrecho entre animales, más oportunidades de visualizar animales enfermos y mayor estrés, además de prácticas extendidas de compartir agujas (Gardiner y Wilson 1989; Silva et al. 2002; Cuglovici et al. 2010, Bastos et al. 2017, Batista et al. 2018, Souza et al. 2018). Como fue mencionado, en Uruguay se realiza la vacunación obligatoria contra la Fiebre Aftosa, de todo el rodeo en el período de febrero-marzo y de los bovinos menores de 2 años en el período de mayo-junio (MGAP 2018, MGAP 2019) pudiendo ser un factor importante en la transmisión de agentes hemotrópicos.

Para poder validar completamente este protocolo es necesario hacer ensayos de repetibilidad, reproducibilidad inter-laboratorio así como inter-operador (Monzón et al. 2000, Bossard et al. 2021). Según Desquesnes y la OMSA la variable “región” es muy importante a la hora de reportar un resultado positivo en algún test serológico teniendo en

cuenta otros factores como ser presentación de cuadro clínico, antecedentes, reportes de otros tripanosomas, etc.

La **falta de ocurrencia de casos clínicos** tanto en bovinos como en equinos, podría explicarse por la similitud de las tripanosomosis con otras enfermedades e incluso la comorbilidad entre ellas, no descartándose la posibilidad del mantenimiento del parásito en animales con manifestaciones subclínicas, períodos de aparasitemia o localizaciones extrasanguíneas del parásito (Bolívar et al. 2006, Batista et al. 2007, Batista et al. 2011, Cadioli et al. 2015). En este sentido, Maldonado et al. (2024) sugiere que podría existir una circulación silenciosa y sub- diagnóstico en comparación con otras enfermedades. La falta de información sobre la posibilidad de que el parásito este circulando en el país dificulta la aparición de casos diagnosticados parasitológicamente.

9 CONCLUSIONES

La prueba de ELISA indirecto dirigido a detectar anticuerpos se ha aceptado como una prueba robusta para realizar encuestas de vigilancia serológica y obtener un panorama general sobre la presencia de tripanosomosis animales.

Las conclusiones derivadas de esta investigación son las siguientes:

1. Se obtuvo un suero bovino positivo anti- *T. vivax* para ser utilizado como control positivo en ausencia de muestras de referencia.
2. Se desarrolló un ensayo de ELISA capaz de detectar sueros reaccionantes a *T. vivax* con buena sensibilidad y especificidad.
3. En paralelo se desarrolló un ensayo de ELISA que detecta anticuerpos anti- *T. evansi*
4. Se evaluó la reactividad cruzada entre estos dos ensayos.
5. Se determinó una seroprevalencia a *T. vivax* del 32% en bovinos.

Es importante destacar que el hecho de que existan reacciones cruzadas en los test serológicos de detección de anticuerpos, nos lleva a concluir que existen animales con anticuerpos contra al menos un tripanosoma y el hallazgo del parásito por métodos directos convencionales se hace imprescindible para la notificación de la enfermedad. Lo antedicho lleva a plantearnos algunas perspectivas para asentar investigaciones futuras:

- realizar un muestreo representativo de todos los departamentos pudiendo tener en cuenta los datos aquí obtenidos de seroprevalencia y parámetros de los ensayos
- con los resultados anteriores realizar la búsqueda de los parásitos por métodos directos
- obtener aislados locales tanto de *T. vivax* como de *T. evansi*, que posibiliten el desarrollo de kits diagnósticos más específicos.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abdala AA, Larriestra AJ, Signorini M. (2020). Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. Rev. Vet. 31:2,115-119, 2020.
2. Abrão DC, Carvalho A Último de, Facury Filho EJ, Saturnino HM, Ribeiro MFB. Impacto econômico causado por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino leiteiro no estado de minas gerais. Ciênc. anim. bras. [Internet]. 20º de outubro de 2009 [citado 27º de setembro de 2023];1:672-6. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/7882>
3. Andrade Neto AQ, Mendonça CL, Souto RJC, Sampaio PH, Junior OLF, André MR, Machado RZ, Afonso JAB. (2019). Diagnostic, Clinical and Epidemiological aspects of dairy cows naturally infected by *Trypanosoma vivax* in the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. Brazilian Journal of Veterinary Medicine, 41(1), e094319. <https://doi.org/10.29374/2527-2179.bjvm094319>
4. Angara T-EE, Ismail AA, Ibrahim AM. (2014). An Overview on the Economic Impacts of Animal Trypanosomiasis. Volume-3, Issue-7, July-2014 • ISSN No 2277 – 8160.
5. Aregawi WG, Agga GE, Abdi RD, Buscher P. (2019). Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. Parasit Vectors. 2019 Jan 31;12(1):67. doi: 10.1186/s13071-019-3311-4. PMID: 30704516; PMCID: PMC6357473.
6. Arias JF, García F, Rivera M, López R. (1997). *Trypanosoma evansi* in capybara from Venezuela. J Wildl Dis. 1997 Apr;33(2):359-61. doi: 10.7589/0090-3558-33.2.359. PMID: 9131577.
7. Auty H, Torr SJ, Michoel T, Jayaraman S y Morrison LJ. (2015). Cattle trypanosomosis: the diversity of trypanosomes and implications for disease epidemiology and control. Revue Scientifique et Technique de l'OMSA 34, 587–598
8. Bassi PB, de Araújo FF, Garcia GC, Vinícius da Silva M, Oliveira CJF, Bittar ER, de Souza Gomes M, Rodrigues do Amaral L, Costa E Silva MF, Nascentes GAN, Rodrigues Junior V, Martins-Filho OA, Araújo MSS, Bittar JFF. (2018). Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Exp Parasitol. Feb ;185:98-106. doi: 10.1016/j.exppara.2018.01.010. Epub 2018 Jan 6. PMID: 29309784.
9. Bastos TSA, Faria AM, Madrid DM de C, Bessa LC de, Linhares GFC, Fidelis OL, Sampaio PH, Cruz BC, Cruvinel LB, Nicaretta JE, Machado RZ, Costa AJ, da Lopes WZ. (2017). First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. Rev

Bras Parasitol Vet [Internet]. 2017Jul;26(3):366–71. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017019>

10. Batista JS, Riet-Correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. (2007). Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology* 143 (2007) 174–181
11. Batista JS, Alves CI, Bezerra J, Vasconcelos T, Rodrigues KA, Lopes FC, Lira R. (2017). Avaliação clínica e índices reprodutivos em vacas leiteiras naturalmente infectadas por *Trypanosoma vivax*. *Ciências Agrárias, Londrina*, v. 38, n. 5, p. 3031-3038
12. Batista JS, Dos Santos WLA, de Sousa ACFC, da Silva Teófilo T, Bezerra ACDS, Rodrigues VHV, da Silva Filho JA, Cavalcante TV, de Freitas Mendonça Costa KM, Viana GA. (2022). Abortion and congenital transmission of *Trypanosoma vivax* in goats and ewes in semiarid northeastern Brazil. *Res Vet Sci.* (2022) 149:125–7. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.06.009
13. Bazzalo V, Dubois EF, Giacometti VA, Pertile CN. (2018). Descripción de un caso de *Trypanosoma evansi* en un canino de la localidad de Monte Caseros, provincia de Corrientes; XXII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico; Río Cuarto; Argentina; 2018; 137-137
14. Benavides E, Romero J, Villamil L. (2016). Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático: guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático. Costa Rica, IICA, 2016. 96 p.; 23 cm x 15 cm. ISBN: 978-92-9248-655-6
15. Bezerra FSB, Batista JS. (2008). Efeitos da infeccao por *Trypanosoma vivax* sobre a reproducao: uma revisao. *Acta Vet. Bras.*, v.2, n.3, p.61-66, 2008.
16. Bock R, Jackson L, De Vos A, Jorgensen W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology* (2004), 129, S247–S269
17. Bolívar AM, García-Lugon P, Crisante G, Rojas A, Teixeira M, Añez N. (2006). Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 46(1), 87-90. Recuperado en 20 de agosto de 2024, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482006000100010&lng=es&tlng=es.
18. Bolívar AM. (2013). Detección de *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma vivax* en garrapatas de ganado bovino empleando la reaccion en cadena de la polimerasa. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, vol. 14, núm. 3, marzo, 2013, pp. 1-10
19. Bontempi I, Arias DG, Marcipar IS. (2024). Improved Serodiagnosis of *Trypanosoma vivax* Infections in Cattle Reveals High Infection Rates in the Livestock Regions of Argentina.

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. (dataset). <http://hdl.handle.net/11336/234547>
20. Bossard G, Millogo L, Thévenon S, Vitouley H, Bengaly Z, Desquesnes M. (2021). No more cold-chain failures, using dehydrated reagents in ELISA antibody-detection against animal trypanosomes of African origin. *Vet Parasitol.* 2021 Nov;299:109568. doi: 10.1016/j.vetpar.2021.109568. Epub 2021 Sep 4. Erratum in: *Vet Parasitol.* 2022 Mar;303:109680. PMID: 34500230. (2021)
 21. Botto Nuñez G, Becker DJ, Plowright RK (2019). The emergence of vampire bat rabies in Uruguay within a historical context. *Epidemiology and Infection.* 147, e180, 1–8. <https://doi.org/10.1017/>
 22. Brun R, Hecker H, Lun ZR. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet Parasitol.* Oct;79(2):95-107. doi: 10.1016/s0304-4017(98)00146-0. PMID: 9806490.
 23. Bryan LK, Hamer SA, Shaw S, Curtis-Robles R, Auckland LD, Hodo CL, Chaffin K, Rech RR. (2016). Chagas disease in a Texan horse with neurologic deficits. *Vet Parasitol.* 2016 Jan 30;216:13-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.11.016. Epub 2015 Dec 2. PMID: 26801589; PMCID: PMC7594015.
 24. Buscher P, Gonzatti MI, Hébert L, Inoue N, Pascucci I, Schnauffer A, Suganuma K, Touratier L, Van Reet N. (2019). Equine trypanosomosis: enigmas and diagnostic challenges. *Parasites Vectors* (2019) 12:234
 25. Cadioli FA, Barnabé P de A, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, Fidélis Junior OL, Teixeira MMG, Marques LC. (2012). First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* [Internet]. 2012Apr;21(2):118–24. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200009>
 26. Cadioli FA, Fidelis Junior OL, Sampaio PH, dos Santos GN, André MR, Castilho KJ, Machado RZ. (2015). Detection of *Trypanosoma vivax* using PCR and LAMP during aparasitemic periods. *Vet Parasitol.* Nov 30;214(1-2):174-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.09.001. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26414906.
 27. Camargo RE, Uzcanga GL, Bubis J. (2004). Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Vet Parasitol.* Aug 13;123(1-2):67-81. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.01.022. PMID: 15265572.
 28. Camargo R, Izquier A, Uzcanga GL, Perrone T, Acosta-Serrano A, Carrasquel L, Arias LP, Escalona JL, Cardozo V, Bubis J. (2015). Variant surface glycoproteins from Venezuelan trypanosome isolates are recognized by sera from animals infected with either *Trypanosoma*

- evansi* or *Trypanosoma vivax*. Vet Parasitol. 2015 Jan 15;207(1-2):17-33. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.11.004. Epub 2014 Nov 13. PMID: 25468674; PMCID: PMC4303646.
29. Campigotto G, Volpato A, Galli GM, Glombowsky P, Baldissera MD, Miletto LC, Jaguizeski AM, Stefani LM, Da Silva AS. (2017). Vertical transmission of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected rats, Experimental Parasitology, Volume 174, 2017, Pages 42-44, ISSN 0014-4894, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.01.012>.
 30. Castilho-Neto KJGA, Garcia ABCF, Fidelis Junior OL, Nagata WB, André MR, Teixeira MMG, Machado RZ, Cadioli FA. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. Braz J Vet Parasitol 2021; 30(1): e020220. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612021019>
 31. Castro E, Gil A, Piaggio J, Chifflet L, Farias NA, Solari MA, Moon RD. (2007). Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.020>
 32. CFSPH, 2018. African Animal Trypanosomiasis. The Center for Food Security and Public Health, Iowa State University. Disponible http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/trypanosomiasis_african.pdf
 33. Constable PD, Hinchcliff KW, Done SH, Grünberg W. (2017). Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats, 11th ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, The Netherlands, 2017; p. 2356, ISBN 2978-2350-7020-7057-2350
 34. Crowther J. (2009). The ELISA Guidebook. 10.1007/978-1-60327-254-4. Systems in ELISA. En: The ELISA Guidebook. Methods in Molecular Biology™, vol 516. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-254-4_13
 35. Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. Vet Parasitol 2010; 169(3-4): 320-326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.041>. PMid:20138431
 36. Cuore U, Cardozo H, Solari MA, Cicero L. (2013). Epidemiología y control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. En: Fiel C.; Nari A. Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes. Montevideo. Ed. Hemisferio Sur, pp. 457-484.
 37. Davison HC, Thrusfield MV, Muharsini S, Husein A, Partoutomo S, Rae PF, Masake R, Luckins AG. (1999). Evaluation of antigen detection and antibody detection tests for

- Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia', *Epidemiology and Infection*, vol. 123, no. 1, pp. 149-55.
38. De Kruif P. (1950). *Cazadores de microbios*. 8va edición. Editorial Claridad, Argentina, pp 365, capítulo IX.
 39. de Melo-Junior RD, Bastos TSA, Couto LFM, Cavalcante ASA, Zapa DMB, de Moraes IML, Heller LM, Salvador VF, Leal LLLL, Franco AO, Miguel MP, Ferreira LL, Cadioli FA, Machado RZ, Lopes WDZ. (2024). *Trypanosoma vivax* in and outside cattle blood: Parasitological, molecular, and serological detection, reservoir tissues, histopathological lesions, and vertical transmission evaluation. *Res Vet Sci*. 2024 Jul;174:105290. doi: 10.1016/j.rvsc.2024.105290. Epub 2024 May 6. PMID: 38776695.
 40. Desquesnes M, Tresse L. (1996). Evaluation de la sensibilité du test de Woo pour la détection de *Trypanosoma vivax*. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.*, 1996, 49 (4) : 315-321
 41. Desquesnes M. (1997). Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques: méthode, intérêts et limites. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16, 809–823.
 42. Desquesnes M, Bengaly Z, Millogo L, Meme Y, Sakande H. (2001a). The analysis of the cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can improve identification of the parasite species involved. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol 95, N°2, 141-153.
 43. Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungana A, Dávila AMR. (2001b). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *International Journal for Parasitology* 31: 610-614.
 44. Desquesnes M, Dávila AM. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet Parasitol*. Nov 11;109(3-4):213-31. doi: 10.1016/s0304-4017(02)00270-4. PMID: 12423934.
 45. Desquesnes, M. (2004). *Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America*.
 46. Desquesnes, M.; Holzmüller, P.; Lai, D.; Dargantes, A. Lun, Z. and Sathaporn Jittaplaong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects.
 47. Desquesnes M. (2017). Compendium of Diagnostic Protocols of the OMSA Reference Laboratory for Animal Trypanosomoses of African Origin. In: Nagana: infections with salivarian trypanosomoses (excluding *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2021*. Paris: OMSA. <https://www.omsa.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrialmanual-online-access/>. Acceso 9/1/2023

48. Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, Gimonneau G, Truc P, Herder P, Ravel S, Sereno D, Jamonneau V, Jittapalapong S, Jacquiet P, Solano P, Berthier D. (2022a). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites Vectors* 15, 64 <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>
49. Desquesnes M, Sazmand A, Gonzatti M, Boulangé A, Bossard G, Thévenon S, Gimonneau G, Truc P, Herder S, Ravel S, Sereno D, Waleckx E, Jamonneau V, Jacquiet P, Jittapalapong S, Berthier D, Solano P, Hébert L. (2022b). Diagnosis of animal trypanosomoses: proper use of current tools and future prospects. *Parasites Vectors* 15, 235 (2022). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05352-1>
50. Dos Santos FCB, Lisboa CV, Xavier SCC, Dario MA, Verde RdeS, Calouro AM, Roque ALR, JansenAM. (2017). *Trypanosoma* sp. diversity in Amazonian bats (Chiroptera; Mammalia) from Acre State, Brazil. *Parasitology*, 145(06), 828–837. doi:10.1017/s0031182017001834
51. Dyonisio GHS, Batista HR, da Silva RE, Azevedo RCFE, Costa JOJ, Manhães IBO, Tonhosolo R, Gennari SM, Minervino AHH, Marcili A. (2021). Molecular Diagnosis and Prevalence of *Trypanosoma vivax* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) in Buffaloes and Ectoparasites in the Brazilian Amazon Region. *J Med Entomol.* 2021 Jan 12;58(1):403-407. doi: 10.1093/jme/tjaa145. PMID: 32696974
52. Ferenc SA, Stopinski V, Courteney CH. (1990). The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey in the Eastern Caribbean basin. *Int. J. Parasitol.*, 20, 51–56.
53. Fidelis OL, Sampaio PH, Gonçalves LR, André MR, Machado RZ, Wijffels G. Cadioli FA. (2019). Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, 28(2), 203–209. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019034>
54. Florentin AS, Garcia Perez HA, Rodrigues CMF, Dubois EF, Monzón CM, Teixeira MMG. (2021). Molecular epidemiological insights into *Trypanosoma vivax* in Argentina: From the endemic Gran Chaco to outbreaks in the Pampas. *Transbound Emerg Dis.* 2021;00:1–11.
55. Foil LD, Gorham JR. (2000). Mechanical transmission of disease agents by arthropods. In *Medical Entomology*; Chapt 12; Eldridge, B.F., Edman, J.D., Eds.; Kluwer Academic Publishers: London, UK, 2000; p. 461.
56. Galiza GJ, Garcia HA, Assis AC, Oliveira DM, Pimentel LA, Dantas AF, Simões SV, Teixeira MM, Riet-Correa F. (2011). High mortality and lesions of the central nervous system in trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. *Vet*

- Parasitol;182(2-4):359-63. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.016. Epub 2011 May 19. PMID: 21664764.
57. García HA, Rodrigues AC, Rodrigues CMF, Bengaly Z, Minervino AHH, Riet-Correa F, Machado RZ, Paiva F, Batista JS, Neves L, Hamilton PB, Teixeira MMG (2014). Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. *Parasites & Vectors* 2014, 7:210
 58. Gardiner PR, Wilson AJ. (1987). *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Parasitology Today*, vol. 3, no. 2
 59. Giaretta P (2022). Tripanossomíase em Equinos. En Riet Correa F, Schild AL, Amaral de Lemos RA, Junqueira JR, de Souza F, Machado M. *Doenças de Ruminantes e equídeos*. MedVet. 4ª ed. Sao Paulo. Cap. 7 Doenças parasitárias. p. 757-763.
 60. Gizaw Y, Megersa M, Fayera T. (2017). Dourine: a neglected disease of equids. *Trop Anim Health Prod.* 2017 Jun;49(5):887-897. doi: 10.1007/s11250-017-1280-1. Epub 2017 Apr 24. PMID: 28439783; PMCID: PMC5432633.
 61. Gómez-Piñeres E, Boada-Sucre A, Breña A, Contreras-Breña M, García F, Reyna-Bello A. (2014). Morfometría Comparativa de Cinco Aislados Venezolanos *Trypanosoma vivax*. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 55(1), 25-33. Recuperado en 02 de agosto de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762014000100005&lng=es&tlng=es.
 62. Greif G, Ponce de Leon M, Lamolle G, Rodriguez M, Piñeyro D, Tavares-Marques LM, Reyna-Bello A, Robello C, Alvarez-Valin. F. (2013). Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC Genomics*. 2013;14:149. Published 2013 Mar 5. doi:10.1186/1471-2164-14-149
 63. Greif, G. (2015). Genómica funcional y evolutiva de tripanosomas africanos: el modelo *Trypanosoma vivax*. Tesis de Doctorado Ciencias Biológicas, Pedeciba
 64. Greif, G.; Faral-Tello, P., Scardoelli, C.; Hernandez, A.; Basmadjian, Y., Robello, C. (2018). The first case report of trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in Uruguay. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 11: 19:21.
 65. Grill F, Zurmendi M. (2017). Leishmaniasis visceral en Uruguay Visceral leishmaniasis in Uruguay. *Arch Pediatr Urug* 2017; 88(1):32-38.
 66. Guarino H, Galera Castilho J, Souto J, de Novaes Oliveira R, Carrieri ML, Kotait, I. (2013). Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus research*. 173, 415-420.

67. Herrera HM, Dávila AMR, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D'Andrea PS, Jansen AM. (2004). Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. Veterinary Parasitology. 125(3-4): 263-275.
68. Jackson AP, Goyard S, Xia D, Foth BJ, Sanders M, Wastling JM, et al. (2015) Global Gene Expression Profiling through the Complete Life Cycle of *Trypanosoma vivax*. PLoS Negl Trop Dis 9(8):e0003975. doi:10.1371/journal.pntd.0003975
69. Jones TW, Dávila AMR.(2001). *Trypanosoma vivax*-out of Africa. TRENDS in Parasitology Vol. 17 No.2
70. Kapo N, Goletić T, Škapur V, Softić A, Goletić Š, Omeragić J. (2023). Epidemiology of Animal Trypanosomiasis. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.113794
71. Kocan K M, de la Fuente J, Blouin E F, Coetzee J F y Ewing S A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol 167(2-4), 95–107.
72. Kristjanson PM, Swallow BM, Rowlands GJ, Kruska RL, de Leeuw PN. (1999). Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research. Volume 59, Issue 1, 1999, 79-98, ISSN 0308-521X, [https://doi.org/10.1016/S0308-521X\(98\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0308-521X(98)00086-9).
(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308521X98000869>)
73. Krolow TK, Lucas M, Henriques AL. (2022). Revisiting the Tabanid Fauna (Diptera: Tabanidae) of Uruguay: Notes on the Species of the Genus *Tabanus* Linnaeus, with the Description of a New Species. Neotrop Entomol 51, 447–457. <https://doi.org/10.1007/s13744-022-00958-7>
74. Lai DH, Hashimi H, Lun ZR, Ayala FJ, Lukes J. (2008). “Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*,” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 105, no. 6, pp. 1999–2004, 2008.
75. Linhares GFC, Dias Filho F de C, Fernandes PR, Duarte SC. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). Ciênc. anim. bras. [Internet]. 25° de dezembro de 2006 [citado 29° de setembro de 2023];7(4):455-60. Disponible en: <https://revistas.ufg.br/vet/article/view/876>
76. Lucas M. (2019). Diversidad y estacionalidad de las especies de tábanos (Díptera: Tabanidae) en Uruguay. Tesis de Maestría en Salud Animal. Facultad de Veterinaria, UDELAR.

77. Luckins AG. (1977). Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. Trop Anim Health Prod. 1977 Feb;9(1):53-62. doi: 10.1007/BF02297393. PMID: 333677.
78. Madruga C. (2004). Diagnóstico e epidemiologia do *Trypanossoma (Duttonella) vivax* no Brasil. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG.
79. Madruga CR, Araújo FR, Cavalcante-Goes G, Martins C, Pfeifer, I.B.; Ribeiro LR, Kessler RH, Soares CO, Miguita M, Melo EPS, Almeida RFC, Lima JR. (2006). The development of an enzymelinked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v.101, p.801-807, 2006
80. Maldonado C, Cáceres A, Burgos A, Hinojosa D, Enríquez S, Celi-Erazo M, Vaca F, Ron L, Rodríguez-Hidalgo R, Benítez-Ortiz W, Martínez-Fresneda M, Eleizalde MC, Mendoza M, Navarro JC, Ramírez-Iglesias JR. (2024). Seroprevalence of trypanosomosis and associated risk factors in cattle from coast and amazonian provinces of Ecuador. Vet Res Commun 48, 1891–1898 (2024). <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10333-z>
81. Marques L, Moon R, Cardozo H, Cuore U, Trelles A, Bordaberry S. (1997). Primer diagnóstico de resistencia de *Haematobia irritans* (diptera: muscidae) en Uruguay: determinación de susceptibilidad a cypermetrina y diazinon. Veterinaria (Montev.) [Internet]. 1 de marzo de 1997 [citado 29 de septiembre de 2023];33(133):20-3. Disponible en: <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/537>.
82. Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. Int J Parasitol. 1992;22:909–18. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90047-O](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90047-O)
83. Mazzei E, De Souza M. (2013). La frontera en cifras. <https://www.cci.edu.uy/publicaciones/cci-05/5.pdf>
84. Mazzucco M, Novoa MB, Sarli M, Porcietto S, Lisandro M, Echaide IE. (2022). Casos de anaplasmosis, babesiosis y tripanosomiasis bovina registradas en el INTA Rafaela (2012-2019); Universidad Nacional de Nordeste; Revista Veterinaria; 33; 2; 12-2022; 177-182
85. MGAP (2018). http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/dgsg_no_392_18_12_2018.pdf
86. MGAP (2019) http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/dgsg_no_120_25_04_2019.pdf
87. Miraballes C, Buscio D, Diaz A, Sanchez J, Riet-Correa F, Saravia A, Castro-Janer E. (2017). Efficiency of a walk-through fly trap for *Haematobia irritans* control in milking cows in Uruguay. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.10.002>

88. Moleta E (2022), Tripanossomíase em Bovinos. En Riet Correa F, Schild AL, Amaral de Lemos RA, Junqueira JR, de Souza F, Machado M. Doenças de Ruminantes e equídeos. MedVet. 4ª ed. Sao Paulo. Cap. 7 Doenças parasitárias. p. 751-756.
89. Monzón CM, Hoyos CB, Jara GA. (1995a). Brotes de tripanosomosis equina causada por *Trypanosoma evansi* en Formosa, Argentina. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.,1995-1 4 (3), 747-752
90. Monzón CM, Jara A, Nantulya VM. (1995b). Sensitivity of antigen ELISA test for detecting *Trypanosoma evansi* antigen in horses in the subtropical area of Argentina. J Parasitol. 1995;81:806–8.
91. Monzón CM. (2000). Validación De Una Prueba Inmunoenzimática Indirecta Para La Detección De Anticuerpos Anti-*Trypanosoma Evansi* En Equinos De Argentina. Rev. Sci.Tech.Off. Int. Epiz. , 19 (3): 810-818
92. Monzón CM, Mancebo OA, Jiménez JN. (2010). *Trypanosoma vivax* en Búfalos (*Bubalus bubalis*) en Formosa, Argentina.Vet. Arg. Vol. XXVII N° 268 Agosto 2010.
93. Monzón C. M.; Mancebo O. A.; Giménez J. M.; Russo A. M. (2013) Evolución de la Tripanosomosis bovina por *Trypanosoma vivax* en Formosa (Argentina). Años 2007-2012 y su potencial dispersión en el país. Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol. (2013); 72 (1): 38-44
94. Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. Parasitology. 1989;99:57–66. [https:// doi. org/ 10. 1017/ S0031 18200 0061023](https://doi.org/10.1017/S0031182000061023).
95. Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Davila AM. (2005). The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. Parasitol Res 95: 186-192.
96. OMSA (2014). Directriz sobre validación 3.6.6. Eleccion y uso de tipos y grupos de muestras de referencia. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/aahm/3.6.6_REFERENCE_SAMPLES.pdf. Acceso 20/12/23
97. OMSA (2021a). Nagana: infections with salivarian trypanosomoses (excluding *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*). Capítulo 3. 4. 14. Disponible en https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.04.14_NAGANA.pdf. Acceso 9/1/23
98. OMSA (2021b). Surra in all species (*Trypanosoma evansi* infection) Capítulo 3. 1. 21. Disponible en

https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.21_SURRA_TRY_PANO.pdf. Acceso 12/1/23

99. OMSA (2023). <https://wahis.woah.org/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>. Acceso 8/9/23.
100. Orozco M, Argibay HD, Minatel L, Guillemi EC, Berra Y, Schapira A, Di Nucci D, Marcos A, Lois F, Falzone M, Farber MD. (2020). A participatory surveillance of marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) morbidity and mortality in Argentina: first results. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 321. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02533-x>
101. Osório AL, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LR, Costa SC. (2008) *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World. A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 103(1): 1-13.
102. Parodi P, Freire J, Armúa-Fernández MT, Félix ML, Guerisoli D, Bazzano V, Carvalho L, Venzal JM. (2018). Diagnóstico parasitológico y molecular de tripanosomiasis canina por *Trypanosoma evansi* en perros asociados a la caza en dos localidades del Departamento de Artigas, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo) Volumen 54 N° 210 - 5* (2018) 29-35
103. Pereira HD, Simões SVD, Souza FAL, Silveira JAG, Ribeiro MFB, Cadioli FA, Sampaio PH. (2018). Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. *Pesq Vet Bras* [Internet]. 2018May;38(5):896–901. Available from: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5303>
104. Pertile CN, Dubois F, Medina AS, Sarmiento NF. (2020). Mortalidad de equinos por *Trypanosoma evansi* en Argentina. *Diagnóstico parasitológico y molecular. Rev. Vet.* 32: 1, 117-119, 2021
105. Pillay D, Izotte J, Fikru R, Buscher P, Mucache H, et al. (2013) *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. *PLOS ONE* 8(10): e78565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078565>
106. Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, Guhl F. (2013). Trypanosome species in Neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications, *Infection, Genetics and Evolution* (2013), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.022>
107. Ramírez R. (2017). Evaluación clínica, patológica y proteómica de dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba, Venezuela.
108. Rebeski DE, Winger EM, Van Rooij EM, Schöchl R, Schuller W, Dwinger RH, Crowther JR, Wright P. (1999). Pitfalls in the application of enzyme-linked immunoassays

- for the detection of circulating trypanosomal antigens in serum samples. *Parasitol Res.* Jul;85(7):550-6. doi: 10.1007/s004360050594. PMID: 10382604.
109. Reid SA, Copeman DB. (2003). The development and validation of an antibody–ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. *Prev. Vet. Med.*, 61, 195–208.
 110. Reyna-Bello A, Garcia FA, Rivera M, Sanso B, Aso PM. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Veterinary Parasitology* 80, 149-157.
 111. Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Barros CSL. (2009). Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* Infection of Horses. *Vet Pathol* 46: 251–258
 112. Rodrigues CM, Batista JS, Lima JM, Freitas FJ, Barros IO, Garcia HA, Rodrigues AC, Camargo EP, Teixeira MM. (2015). Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semiarid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. *Parasit Vectors.* Oct 28;8:564. doi: 10.1186/s13071-015-1169-7. PMID: 26510460; PMCID: PMC4625931.
 113. Rodrigues MS, Lima L, Xavier SCDC, Herrera HM, Rocha FL, Roque ALR, Teixeira MMG, Jansen AM. (2019). Uncovering *Trypanosoma* spp. diversity of wild mammals by the use of DNA from blood clots. *Int J Parasitol Parasites Wild.* Feb 14;8:171-181. doi: 10.1016/j.ijppaw.2019.02.004. PMID: 30847276; PMCID: PMC6389730.
 114. Ruiz F, Allassia M, Bontempi I, Zimmermann R, Aguirre F. (2021). Hallazgo de *Trypanosoma vivax* en Córdoba, Argentina; Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Hospital de Salud Animal; Casos de Salud Animal; 2; 12-2021; 1-2
 115. Ruiz MF, Volkart S, Allassia M, Aguirre F, Zimmermann R, Barolin J, Jaime J, Florentin A. (2018). Hallazgos de *Trypanosoma vivax* en rodeo de cría: primer reporte en la Provincia de Santa Fe (Argentina).
 116. Salomón OD, Basmajdian Y, Fernández MS, Santini MS. (2011). *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 106(3): 381-382, May 2011.
 117. Salvatella R. (2016). Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención *Arch Pediatr Urug* 2016; 87(1):49-52
 118. Samoel GVA, Fernandes FDA, Roman IJ, Rodrigues BT, Milette LC, Bräunig P, Rojas R, Sangioni LA, Felipetto J, Vogel FSF. (2023). Detection of anti-*Trypanosoma* spp.

- antibodies in cattle from southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 33(1), e013723.
119. Satragno D, Faral-Tello P, Canneva B, Verger L, Lozano A, Vitale E, Greif G, Soto C, Robello C, Basmadján Y. (2017). Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay. *Emerg Infect Dis.* 23(3):536-538. doi: 10.3201/eid2303.160377. PMID: 28221113; PMCID: PMC5382754.
 120. Scayola M, Supparo E, Cedano J, Hernández Z. (2019). Leishmaniosis visceral: presentación en perros de la ciudad de Salto, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* Volumen 55. N° 211 - 6 (2019) 37-46
 121. Seidl AF, Moraes AS, Silva RAMS. (1999). Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 94(2): 269-272, Mar./Apr.1999.
 122. Seidl AF, Moraes AS, Silva RAMS. (2001). *Trypanosoma evansi* control and horse mortality in the Brazilian Pantanal. *Mem I Oswaldo Cruz* 96: 599-602.
 123. Shaw AP, Cecchi G, Wint GR, Mattioli RC, Robinson TP. (2014). Mapping the economic benefits to livestock keepers from intervening against bovine trypanosomosis in Eastern. 113 (2), 197–210.
 124. Silva AS da, Costa MM, Polenz MF, Polenz CH, Teixeira MMG, Lopes STDA, Monteiro SG. (2009). Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural* [Internet]. 2009Nov;39(8):2550–4. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000189>
 125. Silva AS da, Andrade Neto OAS, Costa MM, Wolkmer P, Mazzantti CM, Santurio JM, Lopes STA, Monteiro SG. (2010). Tripanossomose em equinos na região sul do Brasil. *região sul do Brasil Acta Scientiae Veterinariae*. 38(2): 113-120, 2010.
 126. Silva AS da, Garcia HA, Costa MM, França RT, De Gasperi D, Zanette RA, Amado JA, Lopes STA, Teixeira MM, Monteiro SG. (2011). Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitol Res* 108 (1):23- 30. doi: 10.1007/s00436-010-2036-2
 127. Silva AS da, Oliveira CB, Zanette RA, Soares CDM, Coradini G, Polenz CH, Santurio JM, Monteiro SG. (2018). Ocorrência de *Trypanosoma evansi* em bovinos de uma propriedade leiteira no município de Videira - SC, Brasil. *Acta Scientiae Vet.* [Internet]. 2018 Jun. 27 [cited 2023 Sep. 29];35(3):373-6. Available from: <https://seer.ufrgs.br/index.php/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/16133>

128. Silva RAMS, Seidl A, Ramirez L, Dávila AMR. (2002). *Trypanosoma evansi* - *Trypanosoma vivax*. Biología, Diagnóstico y Control. 636.086962 (21 ed). Embrapa 2002
129. Silva RAMS. (2006). Approach on risk factors of bovine trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in the Bolivian and Brazilian pantanals. Vet. e Zootec. 13 (2): 153-162.
130. Silva TMF, Olinda RG, Rodrigues CMF, Câmara ACL, Lopes FC, Coelho WAC, Ribeiro MFB, Freitas CIA, Teixeira MMG, Batista JS. (2013). Pathogenesis of reproductive failure induced by *Trypanosoma vivax* in experimentally infected pregnant ewes. Veterinary Research, 44:1
131. Solari MA, Dutra F, Quintana S. (2013). Epidemiología y prevención de los hemoparásitos (*Babesia* y *Anaplasma*) en el Uruguay. En Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en Rumiantes, editado por César Fiel y Armando Nari, Capítulo 28, 657-688. Uruguay, Editorial Hemisferio Sur.
132. Sood NK, Singla LD, Singh RS, Uppal SK. (2011). Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. Veterinarni Medicina, 56, 2011 (2): 82-84
133. Soulsby E.J.L. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos. 7ª ed. Interamericana S.A, México DF, 823 pp, 1987.
134. Souza A, Ortolani MB, Malacco M. (2018). Guía Practico de Tripanosomose Bovina no Brasil. Reuniao de especialistas em tripanosomose bovina.
135. Tamasaukas R, Tamasaukas C, Cobo M, Rivera S. (2017). Evaluación en campo de un ELISA indirecto, desarrollado con productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina. Fases: I-Preparación y rendimiento de los antígenos, y II-Validación del Ac-ELISA homólogo. MSKN [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 29 de septiembre de 2023];8:29-35. Disponible en: <https://publicaciones.ucuenca.edu.ec/ojs/index.php/maskana/article/view/1481>
136. Tananyutthawongese C, Saengsombut K, Sukhumsirichat W, Uthaisang W, Sarataphan N, Chansiri K. (1999). Detection of Bovine Hemoparasite Infection Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. ScienceAsia 25 (1999): 85-90
137. Thermo Scientific. Tech Tip 65. ELISA technical guide and protocols. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/TR0065-ELISA-guide.pdf>
138. Tizard IR. (2009). Técnicas de inmunodiagnóstico. Introducción a la inmunología veterinaria (8a. ed.). Barcelona [etc.]: Elsevier.

139. Uzcanga G, Mendoza A, Aso PM, Bubis J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*. 124. 287-99. 10.1017/S0031182001001214.
140. Uzcanga GL, Pérez-Rojas Y, Camargo R, Izquier A, Noda JA, Chacín R, Parra N, Ron L, Rodríguez-Hidalgo R, Bubis J. (2016). Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted *Trypanosoma (Duttonella) vivax* parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. *Vet Parasitol*. 2016 Mar 15;218:31-42. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.01.007. Epub 2016 Jan 12. PMID: 26872925.
141. Ventura RM, Paiva F, Silva RAMS, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MMG. (2001). *Trypanosoma vivax*: Characterization of the Spliced-Leader Gene of a Brazilian Stock and Species-Specific Detection by PCR Amplification of an Intergenic Spacer Sequence. *Experimental Parasitology* 99, 37–48. doi:10.1006/expr.2001.4641
142. Vos GJ, Gardiner PR. (1990). Parasite-specific antibody responses of ruminants infected with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*, 100, 93-100.
143. Vicco M H, Ferini F, Rodeles L, Cardona P, Bontempi I, Lioi S, Beloscar J, Nara T, Marcipara I, Bottasso O A. (2013). Valoración de anticuerpos con reactividad cruzada patógeno-huésped en pacientes con diferentes estadios de cardiopatía chagásica crónica. *Rev Esp Cardiol*. 2013;66(10):791–796.
144. Wells EA. (1972). The importance of mechanical transmission in the epidemiology of Nagana: a review. *Trop. anim. Hlth Prod.*, 4, 74-88.
145. Wells EA. (1984). Animal Trypanosomiasis in South America. *Prev. Vet. Med.*, 2: 31-41
146. Wright PF, Nilsson E, Van Rooij EM, Lelenta M, Jeggo MH. (1993). Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech*. 1993;12:435–50.
147. Zapata R, Cardona EA, Reyes J, Triana O, Peña VH, Ríos LA, Barahona R, Polanco D. (2017). Tripanosomiasis bovina en ganadería lechera de trópico alto: primer informe de *Haematobia irritans* como principal vector de *T. vivax* y *T. evansi* en Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria*, (33), 21-34. <https://doi.org/10.19052/mv.4048>

ANEXOS

ANEXO I. PROTOCOLO DE INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

PROTOCOLO DE INMUNIZACIÓN EXPERIMENTAL

Objetivo:

Desarrollo de anticuerpos policlonales de origen bovino, que reconozcan el parásito *Trypanosoma vivax*.

T. vivax es un protozoo parásito que afecta principalmente ganado Bovino y Ovino. El parásito de origen africano, ingresó al continente americano con animales infectados a partir del siglo XV. En su continente de origen y también en América produce importantes pérdidas económicas. En América Latina, se han hecho reportes de su presencia desde el Caribe, hasta el sur de Brasil y Argentina. Al tratarse de una enfermedad emergente en la región, nos encontramos abocados al desarrollo de un test de screening de los rodeos nacionales buscando la presencia del parásito en el país. El contar con anticuerpos Bovinos que reconozcan al parásito (Suero positivo) es un punto clave para el desarrollo de la técnica propuesta (ELISA).

Para este protocolo es necesario un único animal en el protocolo que se describe a continuación.

Protocolo experimental propuesto

Producción de anticuerpos policlonales de vaca mediante inmunización con un extracto de proteínas totales del parásito *Trypanosoma vivax* Y486. El extracto corresponde a un lisado total de parásitos aislados de ratones infectados.

El protocolo se realizará de la siguiente manera:

Se realizará la inmunización de un bovino de 1-2 años de edad (sexo indistinto), previo a la primera inmunización se tomará una muestra de 10 mL de Sangre de la vena coccígea utilizando vacutainer (obtención de suero pre-inmune).

La primera inmunización se realizará con 150 ug de extracto total de proteínas en 1.5 mL de Buffer Carbonato (pH), se emulsiona en adyuvante oleoso (1:1). La dosis final de 3 mL se inyecta de forma subcutáneas en diferentes puntos para potenciar la respuesta inmune. Se realizarán dos inmunizaciones más en las semanas 2 y 4 con adyuvante incompleto de Freund siguiendo el mismo esquema. Una semana después de la segunda y tercera inmunización se sacará sangre de la vena coccígea para monitorear la producción de anticuerpos. De ser necesario se realizará una cuarta inmunización dos semanas después de la última.

Se realizará sangrado de 50 mL una semana después de que se haya demostrado la producción de anticuerpos contra el extracto de interés.

El animal, podrá ser liberado en campo durante el protocolo y luego de realizado el mismo.

Buffer Carbonato:

Bicarbonato de sodio (0.036M final) 0.303 g

Carbonato de sodio (0.06M final) 0.6 g

En 100 mL de agua bidestilada

pH=9.6

Gonzalo Greif (IPM)

Cecilia Miraballes (INIA)

Fabiana López (DILAVE RN)

ANEXO II. PROTOCOLO CEUA

Montevideo, 25 de mayo de 2017

A quien corresponda:

Se deja constancia que el protocolo de experimentación animal N° 004-17 del proyecto titulado: **"Análisis de transcriptoma de forma sanguínea del parásito *Trypanosoma vivax*"** y cuyo responsable es Gonzalo Greif, fue evaluado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo.

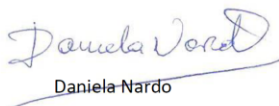
Luego de haber realizado un estudio detallado sobre los protocolos presentados, esta Comisión entiende que el mencionado proyecto cumple con todas las normas legales vigentes en investigación (ley 18.611).



Martina Crispo



Marcelo Comini



Daniela Nardo



Paola Contreras



Mercedes Segovia

CEUA
Institut Pasteur de Montevideo

Matajojo 2020
11400 - Montevideo
Teléfono: (+598) 2 522 09 10
Fax: (+598) 2 522 41 85



ANEXO III. PROTOCOLO DE ELISA INDIRECTO ESTANDARIZADO

ELISA N°

FECHA DE SENS.:

ELISA para analizar SUEROS Protocolo General modificado GG y FL (versión nov_21)

1- Sensibilización

Sembrar 100µL/pozo de una solución de proteína (5 µg/ml) en buffer carbonato-bicarbonato. Incubar O/N a 4°C.

2- Bloqueo

Bloquear la placa con 200µL/pozo de PBS-leche (5%). Incubar 1h a 37°C

3- Lavado

Lavar 3 veces con 200µL/pozo de PBS-0.05%Tween-20.

4- Sueros

Sembrar 100µL/pozo de diluciones seriadas del suero en PBS-leche (5%) (dejar un pozo para sembrar sólo con PBS-leche (5%), sin suero). Incubar 2 hs a 37°C.

5- Lavado

Lavar 5 veces con 200µL/pozo de PBS-0.05%Tween-20.

6- Anticuerpo de detección

Agregar 100µL/pozo del anticuerpo secundario anti IgG conjugado a peroxidasa (1/10000, depende del conjugado) en PBS-leche (5%) Incubar 1h a 37°C.

7- Lavado

Lavar 7 veces con 200µL/pozo de PBS-0.05%Tween-20.

8- Sustrato

Agregar 100µL/pozo de sustrato (25 mL buffer citrato pH5, 1 pastilla opd y 10 uL H₂O₂). Incubar 30min a TA y oscuridad.

9- Stop de la reacción

Agregar 50µL/pozo de solución stop 3M HCL o 3M H₂SO₄.

10- Revelado

Leer DO a 492nm.

Buffer fosfato-citrato:

25.7mL 0.2M Na₂HPO₄

24.3mL 0.1M ácido cítrico

Ajustar el pH a 5.0

Precisamos 5 mL HCL 3M. 500 mL PBS-T. 100 mL Sol. Bloqueo.

ANEXO IV. SOLUCIONES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN iELISA

BUFFER CARBONATO/BICARBONATO (DILUCION DEL ANTÍGENO)

Concentración 5 ug/mL= 10 uL de “EP3” en 10 mL de buffer para una placa entera.

Ajustar pH 9.6, preferentemente recién preparado.

Agua destilada estéril (enrasar)	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Carbonato de Na (Na ₂ CO ₃)	1,58 g	0,79 g	0,395 g	0,158 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	2,93 g	1,465 g	0,732 g	0,293 g

PBS 10X= SOLUCION MADRE

Agua destilada esteril (enrasar)	1000 mL	500 mL	250 mL	100 mL
Na ₂ HPO ₄ anhidro - PM: 141,96	15 g	7,5 g	3,75 g	0,15 g
KH ₂ PO ₄ anhidro – PM: 136,09	2 g	1 g	0,5 g	0,2 g
NaCl - PM (g/mol): 58,44	80 g	40 g	20 g	0,8 g
KCl - PM: 74,56	2 g	1 g	0,5 g	0,2 g

Medir pH: 7,4. Esterilizar en botellas de 500 mL.

PBS 1X 0,05% Tween 20 (LAVADOS)

Enrasar con agua destilada estéril	500 mL	1000 mL
PBS 10 X	50 mL	100 mL
Tween 20	0,25 mL	0,5 mL

Agregar el Tween con micropipeta de P1000, cortar la punta del tip ya que es muy espeso. Mezclar bien.

PBS 5% LECHE PARA BLOQUEO, DILUCION DE SUEROS Y DILUCION DE ANTICUERPO SECUNDARIO

Pesar 2,5 g leche desnatada en polvo

Agregar 5 mL PBS 10 X

Enrasar a 50 mL con agua destilada estéril

Agitar en agitador magnético o vigorosamente

BUFFER FOSFATO-CITRATO (SUSTRATO)

Na ₂ HPO ₄ (PM= 141,96) 0.2 M	2,84 g en 100 mL agua
Ácido cítrico (PM= 201) 0.1 M	2 g en 100 mL agua
Ph	5

Preferentemente preparar en el momento. Para subir pH se puede usar NaOH 10M (unas gotitas) y para bajar HCl.