Evaluación del desempeño de tres pares de cebadores para la detección de *Trypanosoma vivax* mediante PCR en búfalos de la Granja Experimental Villa Marina.

Heidy Jazmín Albarracín Tarazona



Trabajo de Grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Medicina Veterinaria
Universidad de Pamplona, Pamplona- Norte de Santander.
La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada:
heidy.albarracinhei@unipamplona.edu.co

Noviembre, 2025

Evaluación del desempeño de tres pares de cebadores para la detección de *Trypanosoma vivax* mediante PCR en búfalos de la Granja Experimental Villa Marina.

Trabajo de Grado como requisito para optar al título de Médica Veterinaria

Director

Jesús Alberto Mendoza Ibarra DVM M. Sc.; Ph. D.

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Medicina Veterinaria

Universidad de Pamplona

Pamplona, Norte de Santander, Colombia

2025

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios y a mi familia por acompañarme en cada etapa de mi vida. En especial a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, y a mi prima Brenda, quien ha estado conmigo en cada momento.

A mis compañeros, especialmente a Karen Gutiérrez, por acompañarme desde el inicio de este proceso; por compartir no solo los momentos felices, sino también los más exigentes, tanto dentro como fuera de la universidad.

Agradezco profundamente a mis docentes, quienes aportaron a mi formación como Médica Veterinaria, y de manera especial a mi tutor, Jesús Alberto Mendoza, por su disposición, guía y paciencia para compartir su conocimiento.

Finalmente, a los miembros del Laboratorio del Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL), por sus enseñanzas, orientaciones y compañía durante mi pasantía.

Tabla de contenido

Introducción 10

Descripción del sitio de pasantía 11

Actividades desarrolladas durante la pasantía 12

Resumen 13

Abstract 13

Capítulo I 15

- Planteamiento del problema 15
- Justificación 16
- Objetivos 17
  - Objetivo general 17
  - Objetivos específicos 17

Capítulo II 18

- Introducción 18
- Revisión bibliográfica 19
  - Etiología 19
  - Epidemiología 21
  - Mecanismos de transmisión 22
  - Signos clínicos 24

Diagnóstico 25

Capítulo III 29

Materiales y métodos 29

Población y área de estudio 29

Toma de muestra 29

Parámetros fisiológicos 29

Micro hematocrito 30

Evaluación microscópica 30

Extracción y cuantificación de ADN 31

Revisión bioinformática de cebadores 31

Conformación de pools de ADN 32

Amplificación por PCR 33

Capítulo IV 33

Resultados 33

Parámetros fisiológicos y micro hematocrito 33

Evaluación microscópica 35

Revisión bioinformática de cebadores 35

Técnica de PCR 36

Ensayo complementario de verificación de especificidad 38

Discusión 39

Capítulo V 46

Conclusión 46

Recomendaciones 46

Referencias 48

Anexos 58

Lista de Figuras

Figura 1 Clasificación Taxonómica de *Trypanosoma vivax* **19**

Figura 2 Micrografías Electrónicas de Barrido de *Trypanosoma vivax* 21

Figura 3 Transmisión del Vector con *T. vivax* 22

Figura 4 Frotis Sanguíneo con *Trypanosoma vivax* 26

Figura 5 Etapas en el Ciclo de Amplificación 27

Figura 6 Muestreo Búfalos 30

Figura 7 Frotis Sanguíneo de la Muestra VM20 35

Figura 8 Amplificados por PCR de Muestra de Villa Marina 36

Figura 9 Amplificación por PCR de Muestras del Magdalena Medio 39

Lista de Tablas

Tabla 1 Cebadores y Condiciones de PCR 31

Tabla 2 Conformación de Pools de ADN Utilizados en los Ensayos de PCR..... 32

Tabla 3 Parámetros Fisiológicos y Micro Hematocrito Búfalas 34

Tabla 4 Muestras Positivas por Par de Cebadores Empleados 38

Lista de Anexos

Anexo 1 Resultados Extendidos de Sangre 58

Anexo 2 BLAST Cebador TviSL15 59

Anexo 3 BLAST Cebador TviSL25 59

Anexo 4 BLAST Cebador ILO1264 59

Anexo 5 BLAST Cebador ILO1265 60

Anexo 6 BLAST Cebador TviCatL 60

Anexo 7 BLAST Cebador DTO155 61

Introducción

La medicina veterinaria es una disciplina del área de la salud cuyo principio fundamental es la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, así como el manejo reproductivo y productivo de diferentes especies animales. Para ello, el diagnóstico clínico y el uso de herramientas complementarias de laboratorio constituyen la base para orientar cualquier intervención.

En el campo diagnóstico, las pruebas hematológicas, bioquímicas, microbiológicas y moleculares permiten identificar alteraciones fisiológicas y agentes etiológicos con mayor precisión. En los últimos años, las técnicas moleculares han adquirido especial relevancia, debido a su alta sensibilidad y especificidad, particularmente en enfermedades infecciosas que cursan con cargas parasitarias bajas. Entre las técnicas moleculares aplicadas al diagnóstico se destaca la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de patógenos, cuya alta sensibilidad y especificidad han permitido orientar los tratamientos y mejorar la salud y el bienestar animal.

El presente trabajo corresponde a las actividades realizadas durante la pasantía de investigación desarrollada en el Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL) de la Universidad de Pamplona, institución especializada en el uso de métodos moleculares para el diagnóstico e investigación de enfermedades de interés humano y veterinario.

En este contexto se abordó el estudio de los búfalos de la Granja Experimental Villa Marina, dado el registro de alteraciones fisiológicas y reproductivas compatibles con patologías hemo-parasitarias. Por lo tanto, se planteó la necesidad de optimizar el diagnóstico molecular de

Trypanosoma vivax mediante PCR y establecer su posible relación con alteraciones fisiológicas y hematológicas.

Descripción del sitio de pasantía

El Centro Experimental de Diagnóstico e Investigación Molecular en Enfermedades Parasitarias, Tropicales e Infecciosas (CEDIMOL) fue creado en respuesta a la emergencia sanitaria causada por el SARS-CoV-2 (COVID-19). En julio de 2020 se implementó el primer laboratorio de diagnóstico molecular de esta enfermedad en la ciudad de Cúcuta, gracias al trabajo de los docentes Diana Bohada, Reinaldo Gutiérrez, Jesús Alberto Mendoza y el director del centro, Raúl Rodríguez Martínez. Posteriormente en 2021, mediante un proyecto del Sistema General de Regalías, se implementó una sede del laboratorio en el campus de la Universidad en Pamplona, en donde se desarrolló este trabajo.

En este laboratorio trabajan profesionales y estudiantes pertenecientes a las ciencias biomédicas, tales como, bacteriología, microbiología, biología y medicina veterinaria. Adicionalmente se cuenta con diversas áreas de trabajo: administrativas, recepción de muestras biológicas, área limpia y área sucia; en esta última está compuesta por espacios como: área de toma y recepción de muestras, cabina de desembalaje, extracción e inactivación de ácidos nucleicos (ADN y/o ARN), área de inmunofluorescencia, electroforesis e inmunología. En el área limpia, donde se realizan los procedimientos de PCR, está integrada por las áreas de máster mix, mezcla con los ácidos nucleicos y amplificación de PCR, donde se ubican los termocicladores de tiempo final y tiempo real. Finalmente, se cuenta con un área destinada a microbiología y un área de lavado y desinfección. Dentro de la infraestructura del laboratorio también se cuentan con dos mesones donde se distribuyen algunos equipos y materiales de trabajo general. También se cuenta con oficinas administrativas, una sala de juntas que sirve

como espacio académico para llevar a cabo discusiones, presentaciones, reuniones, trabajos teóricos, revisiones bibliográficas y análisis de resultados.

En el laboratorio se llevan a cabo proyectos de investigación que integran la estandarización de pruebas diagnósticas en diferentes enfermedades infecciosas de interés en medicina humana y veterinaria.

Actividades desarrolladas durante la pasantía

Las actividades realizadas durante la pasantía incluyeron el conocimiento y desarrollo de los principales protocolos utilizados en el procesamiento de muestras en el CEDIMOL, incluyendo las buenas prácticas de laboratorio para el uso correcto de equipos, reactivos y materiales, la desinfección de las zonas de trabajo y el manejo adecuado de los desechos generados en el laboratorio. Posteriormente, las actividades principales consistieron en la toma, el transporte y almacenamiento de muestras sanguíneas para su posterior extracción de ADN y la determinación de su pureza y concentración, con el fin de identificar el parásito *Trypanosoma vivax* mediante la estandarización de la técnica de PCR de punto final en búfalos de la Granja Experimental Villa Marina; para realizar finalmente análisis de datos, lectura, interpretación y escritura del informe final.

Asimismo, se participó en actividades propias del laboratorio, tales como la preparación de reactivos, desinfección y esterilización de materiales; manejo adecuado de residuos y muestras, recolección de muestras en campo para proyectos de investigación y su posterior procesamiento. Además, se participó en capacitaciones sobre los métodos empleados en el centro, incluyendo los métodos de extracción de ADN, la espectrofotometría y los protocolos de PCR. Por otro lado, se contribuyó activamente en las reuniones del Semillero de Investigación de Enfermedades Infecciosas (SIDEIN).

Resumen

La tripanosomiasis causada por *Trypanosoma vivax* representa un desafío diagnóstico en rumiantes debido a su curso crónico y a la baja parasitemia, lo que limita la eficacia de los métodos parasitológicos convencionales. Este estudio evaluó la detección molecular de *T. vivax* mediante tres pares de cebadores (TviSL15/25, ILO1264/1265 y TviCatL/DTO155), complementando los análisis con pruebas bioinformáticas y la caracterización fisiológica y hematológica de los animales. Se identificaron alteraciones como disminución del hematocrito y reducción de la condición corporal, indicadores compatibles con procesos hemotrópicos. Los resultados moleculares mostraron un mejor desempeño de ILO1264/1265 y TviSL15/25, mientras que TviCatL/DTO155 presentó amplificaciones inespecíficas. En conjunto, los hallazgos resaltan la importancia de integrar parámetros clínicos, hematológicos y moleculares para el diagnóstico en búfalos, y subrayan la necesidad de seleccionar marcadores con alta especificidad en regiones donde coexisten múltiples tripanosomas.

Palabras claves: Búfalos, cebadores, PCR, trasmisión mecánica, *Trypanosoma vivax*.

Abstract

Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma vivax* represents a diagnostic challenge in ruminants due to its chronic course and low parasitemia, which limits the effectiveness of conventional parasitological methods. This study evaluated the molecular detection of *T. vivax* using three primer pairs (TviSL15/25, ILO1264/1265, and TviCatL/DTO155), complementing the analyses with bioinformatic tests and the physiological and hematological characterization of the animals. Alterations such as decreased hematocrit and reduced body condition were identified, indicators compatible with hemotropic processes. Molecular results showed better performance of ILO1264/1265 and TviSL15/25, while TviCatL/DTO155 presented nonspecific amplifications.

Taken together, the findings highlight the importance of integrating clinical, hematological, and molecular parameters for diagnosis in buffaloes and underscore the need to select highly specific markers in regions where multiple Trypanosoma species coexist.

Keywords: Buffaloes, primers, PCR, mechanical transmission, *Trypanosoma vivax*.

Capítulo I

Planteamiento del problema

Las tripanosomiasis es una patología hemo-parasitaria causada por protozoos del género *Trypanosoma,* entre sus especies se destacan *T. evansi, y T. vivax*, debido a su impacto en la salud y productividad de los rumiantes domésticos (Gonzatti et al., 2014).

Estas infecciones se caracterizan por generar una alta parasitemia durante la fase aguda con signos clínicos poco específicos como reducción en la producción lechera, apatía, anemia profunda, postración, pérdida de peso, abortos, signos neurológicos caracterizados por tremores musculares, incoordinación motora e hipermetría (Castelli et al., 2021).

En Colombia, la producción de búfalos ha cobrado especial relevancia por su potencial productivo en leche y carne. Sin embrago, diversos estudios han identificado un aumento en los casos positivos de *Trypanosoma spp*. en esta especie. En un estudio realizado con una población de 1200 búfalos en 51 predios ubicados en Antioquia, Córdoba y Sucre se identificó por medio de la técnica de PCR una prevalencia del 4,42% de *Trypanosoma evansi* (Barrientos et al., 2020). De manera complementaria, otros estudios que emplearon extendidos sanguíneos teñidos con Giemsa o Wright reportaron prevalencias de *Trypanosoma* spp. del 2,18% en Córdoba y el Bajo Cauca, del 5% en el Magdalena Medio, del 2,26% en el Caribe colombiano y del 13,4% en Barrancabermeja (Arias y Román, 2019; Jiménez, 2020; Calderón et al., 2016; Zapata et al., 2009).

Los búfalos infectados pueden no presentar signos clínicos evidentes, convirtiéndose en reservorios que perpetúan la transmisión a otros animales mediante vectores hematófagos (Gonzatti et al., 2014). La falta de un diagnóstico confiable limita la implementación de medidas

de control, lo que repercute en pérdidas productivas asociadas a disminución en la ganancia de peso, reducción de la producción láctea y problemas reproductivos (Martinez et al., 2021).

En este contexto, la Granja Experimental Villa Marina ha registrado animales con alteraciones fisiológicas y hematológicas compatibles con tripanosomiasis, lo que plantea la necesidad de implementar métodos moleculares confiables para la detección de *T. vivax*, y de evaluar la posible relación entre la infección y alteraciones en los parámetros fisiológicos y hematológicos en los búfalos.

Justificación

La prevalencia de *T. vivax* en América Latina y África es mayor en los búfalos domésticos en comparación con otras especies susceptibles, incluidos bovinos, caninos, dromedarios, equinos, porcinos, pequeños rumiantes y animales salvajes (Fetene et al., 2021). De esa forma, la tripanosomiasis es un problema de gran relevancia en la salud y en la economía de los sistemas ganaderos tropicales, la cuantificación de las pérdidas económicas debidas a *T. vivax* debe incluir los tratamientos curativos o profilácticos, la asistencia del personal y los veterinarios, y el impacto indirecto en los cultivos y los sistemas agrícolas (Gonzatti et al., 2014).

El diagnóstico oportuno de esta infección es fundamental para preservar la productividad de la explotación y para garantizar el bienestar animal, al evitar los efectos clínicos y subclínicos que deterioran la salud de estos animales (Desquesnes et al., 2022). Para el diagnóstico de esta patología es necesario una combinación de la clínica del paciente, las técnicas serológicas, el diagnóstico parasitológico y molecular (Gonzatti et al., 2014). Sin embargo, el uso del diagnóstico molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha demostrado una mayor sensibilidad y especificidad (Desquesnes et al., 2022). No obstante, es necesario utilizar cebadores específicos para *T. vivax*, ya que la utilización de cebadores inadecuados puede

generar resultados falsos y limitar la confiabilidad de los hallazgos (Desquesnes et al., 2017). Por tanto, validar la detección molecular y evaluar su asociación con parámetros fisiológicos y paraclínicos en búfalos es una estrategia necesaria para fortalecer el diagnóstico.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el desempeño de tres pares de cebadores para la detección de *Trypanosoma vivax* mediante PCR en búfalos de la Granja Experimental Villa Marina.

Objetivos específicos

Analizar la especificidad de tres pares de cebadores mediante análisis bioinformático.

Comparar el desempeño de los tres pares de cebadores en las reacciones de PCR realizadas en muestras individuales y agrupadas.

Caracterizar el perfil fisiológico y hematológico de los animales y su relación con los resultados moleculares.

Capítulo II

Introducción

La tripanosomiasis es una enfermedad parasitaria de amplia distribución en regiones tropicales y subtropicales, que afecta tanto a bovinos como a búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), ocasionando importantes pérdidas económicas debido a la disminución en la producción de carne y leche, abortos, mortalidad y costos de control sanitario (Giordani et al., 2016). En América del Sur, el *Trypanosoma vivax* es la especie de mayor importancia epidemiológica, siendo transmitida principalmente de forma mecánica por insectos hematófagos como los tábanos (*Tabanus spp*.), la mosca de establo (*Stomoxys calcitrans*) y la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*), lo que ha favorecido la rápida diseminación de la enfermedad en áreas libres de la mosca tsé-tsé (Martinez et al., 2021).

Las manifestaciones clínicas de la infección por *T. vivax* incluyen fiebre, anemia, pérdida de condición corporal, edemas subcutáneos, reducción de la fertilidad y, en casos graves, la muerte del animal (Castelli et al., 2021). El diagnóstico convencional se lleva a cabo mediante frotis sanguíneos teñidos con Giemsa o Wright; además de esto, se realiza la técnica del micro hematocrito que resulta útil en fases agudas, pero su sensibilidad disminuye en infecciones crónicas o de baja parasitemia (Ventura et al., 2001). Frente a esta limitante, las técnicas moleculares, especialmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se han consolidado como herramientas de alta sensibilidad y especificidad para la detección del parásito (Cortez et al., 2009). En este contexto, el presente proyecto emplea la extracción de ADN a partir de sangre completa y la amplificación molecular de *T. vivax* mediante PCR, utilizando diferentes pares de cebadores previamente descritos.

Revisión bibliográfica

La tripanosomiasis causada por *Trypanosoma* vivax afecta principalmente a bovinos y bufalinos, esta se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales de América Latina y África (Fetene et al., 2021). Este hemoparásito genera fiebre recurrente, pérdida progresiva de peso, disminución de la condición corporal, alteraciones reproductivas y reducción en la producción de leche y carne (Carvajal, 2019).

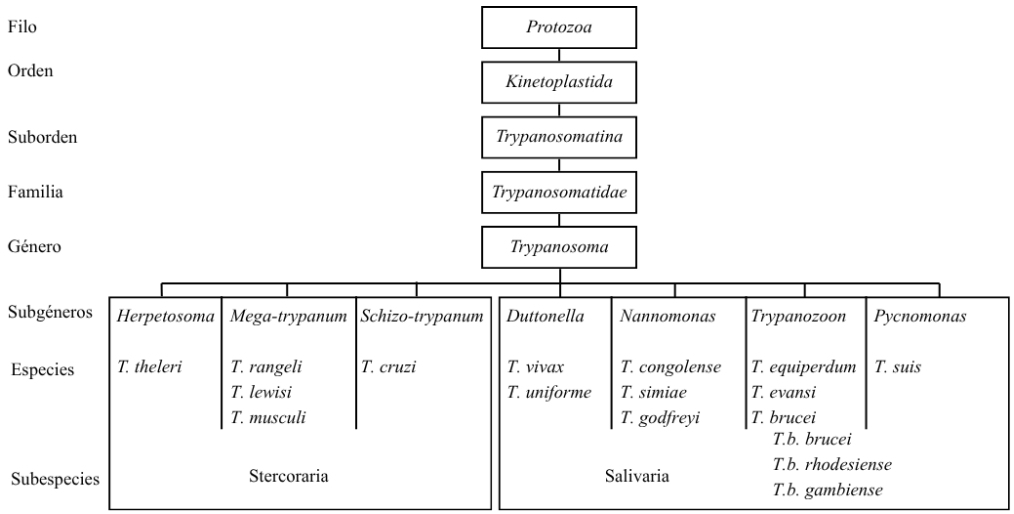
Etiología

La tripanosomiasis es un conjunto de enfermedades causadas por protozoarios extracelulares del género *Trypanosoma*, pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*, un conjunto del orden *Trypanosomatida* que afecta al ganado bovino, así como a mamíferos domésticos y salvajes (Castelli et al., 2021). Estos se clasifican en dos grupos principales, Stercoraria y Salivaria; según su vía de transmisión. El grupo salivaria se caracteriza por una transmisión inoculativa, es decir, el parásito se transmite al hospedador a través de la saliva del insecto durante la hematofagia. Este grupo se dividen en cuatro subgéneros: *Nannomonas*, *Trypanozoon*, *Duttonella* y *Pycnomonas*. El *Trypanosoma vivax* pertenece al subgénero *Duttonella* (Figura 1).

En África, su principal transmisión es por moscas tse-tsé (*Diptera: Glossnidae*). Sin embargo, en América del Sur, su transmisión ocurre de manera mecánica a través de insectos hematófagos (Baral, T., 2010).

Figura 1

Clasificación Taxonómica de Trypanosoma vivax



Nota. Adaptado de Baral, T., 2010.

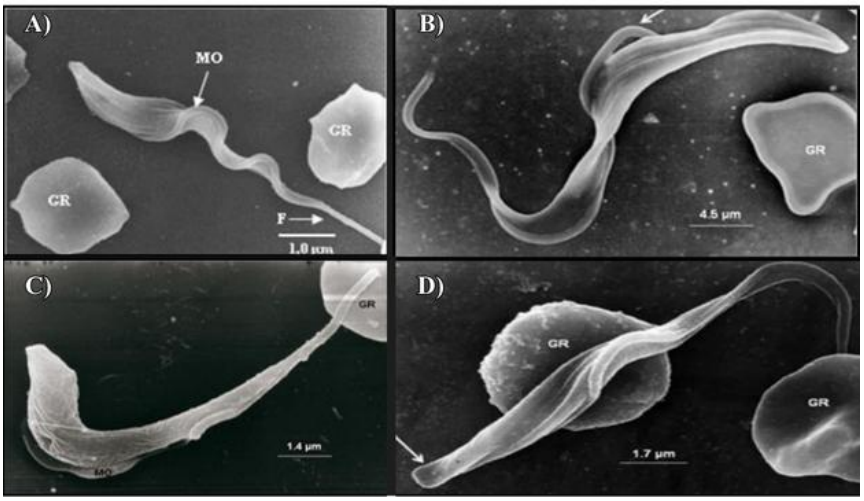
El *T. vivax* se ha considerado una especie monomórfica; sin embargo, estudios recientes sugieren que podría ser pleomórfico (Gómez-Piñeres et al., 2014). Presenta un flagelo libre y terminal que está unido al parásito por una membrana ondulada que es característicamente menos desarrollada que la de *T. evansi* (Castelli et al., 2021).

En su extremo posterior es redondeado, ancho y amplio, con el cinetoplasto prominente situado normalmente cerca o en el extremo terminal, su núcleo se encuentra en la parte media del parásito, dependiendo del aislado es redondeado o alargado (Gómez-Piñeres et al., 2014). El cinetoplasto contiene el ADN mitocondrial y se encuentra dentro de la matriz mitocondrial, cerca del cuerpo basal del flagelo (Gonzatti et al., 2014).

Se han realizado estudios morfológicos y caracterizaciones morfométricas en distintas cepas de *T. vivax* con diversos grados de virulencia (Figura 2), donde mediante microscopía electrónica de barrido se observó que sus extremidades eran planas o puntiagudas, dependiendo del ángulo; además de esto, el flagelo extendido presentaba pronunciadas contorsiones a lo largo del eje del cuerpo del parásito, con una longitud media de las cepas de *T. vivax* entre 16 y 30 μm (Gómez-Piñeres et al., 2014).

Figura 2

Micrografías Electrónicas de Barrido de Trypanosoma vivax



Nota. A) *T. vivax* (TvAA1) con MO: Membrana ondulante y F: Flagelo (10.000X). B) *T. vivax* aislado Trujillo-LIEM176 (TvLIEM176) con parte del flagelo desprendido que sobresale en la parte media del cuerpo por encima de la membrana ondulante (flecha) (12.000X). C) *T. vivax* aislado Guárico-Parmana1 (TvGP1) con gran cantidad de surcos (flecha), MO y F (12.000X). D) *T. vivax* aislado Monagas-Temblador1 (TvMT1) con la porción posterior ancha, bulbosa y un tanto aplanada (flecha), y con una contorsión prominente en la parte media del cuerpo (12.000X). Tomado de Gómez-Piñeres et al., 2014.

Epidemiología

El *Trypanosoma vivax* es una amenaza para la salud y la productividad del ganado en África y América Latina (Fetene et al., 2021). Esta especie, descrita originalmente en Senegal, fue introducida al continente americano alrededor de 1830 mediante el traslado de ganado hacia colonias francesas en la Guayana y el Caribe, documentándose el primer caso en Sudamérica en 1919 (Gonzatti et al., 2014).

Actualmente, se ha detectado en al menos nueve especies domésticas, incluyendo bovinos, bufalinos, equinos, ovinos y caprinos, con mayor prevalencia en búfalos domésticos en América Latina. El *T. vivax* se considera endémico en 12 países latinoamericanos, entre esos Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Perú y Venezuela (Fetene et al., 2021).

En Colombia, la infestación es enzoótica en zonas ubicadas por debajo de los 1000 m.s.n.m. (Gonzatti et al., 2014). El primer caso se reportó en 1929 en Bolívar debido a la importación de ganado proveniente de Venezuela (Virviescas, 1934). Así mismo, en Villavicencio se examinaron 500 bovinos mayores de un año en 50 fincas, donde presentaron una prevalencia entre 6,8 y 9,4% (Agudelo et al., 1984). De igual forma, en el 2014 se examinaron un total de 464 muestras (226 de Antioquia y 238 de Arauca) en explotaciones ganaderas donde se identificó una prevalencia del 6.5% de *Trypanosoma spp*. (Jaimes et al., 2017). Además, se realizó la detección de *T. vivax* en 76 predios bovinos de Caquetá con una prevalencia de 6,6% (Sánchez, 2022).

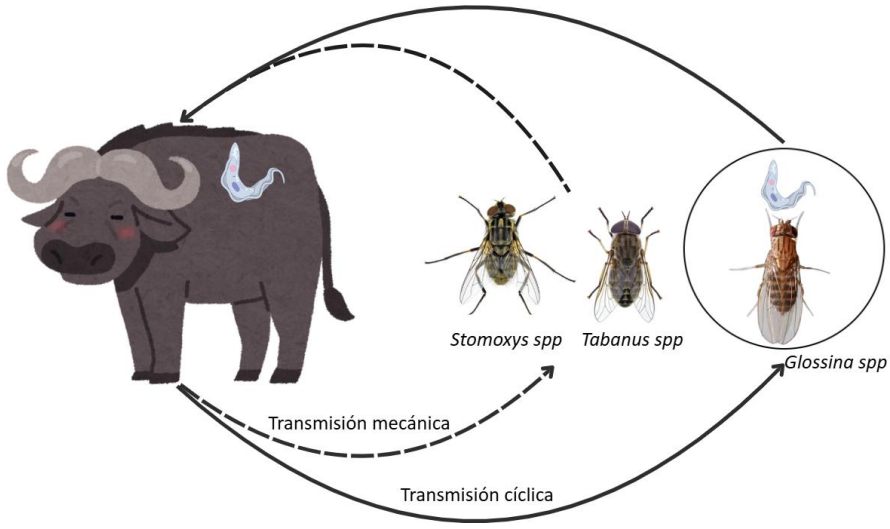
Por otra parte, han aumentado los estudios de casos de *Trypanosoma spp.* en ganado bufalino. En Barrancabermeja se detectó en cuatro hatos una prevalencia de 13,4%, correspondiente a 28 búfalos de un total de 209 animales analizados (Zapata et al., 2009). También, se realizó un estudio en la zona del Magdalena Medio con una población de 1001 búfalos donde obtuvieron una prevalencia de *Trypanosoma spp.* del 5%, donde el departamento con mayor prevalencia fue Antioquia (Jiménez, 2020). Estas cifras reflejan su importancia como limitante para el comercio de ganado en casi toda América Central y del Sur (Fentene et al., 2021).

Mecanismos de transmisión

El *Trypanosoma vivax* es la única especie del grupo de tripanosomas africanos que tiene un modo de transmisión dual (Figura 3); transmisión cíclica o biológica a través de la mosca tse-tsé en el África subsahariana y transmisión mecánica mediante insectos hematófagos en América Central y del Sur, así como en algunas regiones de África (Desquesnes et al., 2022).

Figura 3

Transmisión del Vector con T. vivax



Nota. Transmisión mecánica en América del Sur y transmisión cíclica en África. Fuente propia.

En el ciclo biológico que ocurre en África, el parásito es ingerido por moscas del género *Glossina* durante la hematofagia. Dentro del insecto, el tripomastigote sufre transformaciones sucesivas hacía la fase epimastigota, se replica en la probóscide, la faringe y el esófago del insecto, y finalmente se diferencia en formas metacíclicas infectivas (Gonzatti et al., 2014).

En contraste, en América Central y del Sur, el *T. vivax* se ha adaptado a la transmisión mecánica, donde el parásito es transferido entre animales a través del aparato bucal contaminado de insectos hematófagos, sin que exista desarrollo o multiplicación dentro del vector. Entre los principales vectores mecánicos se encuentran los tábanos (*Tabanus spp*.), la mosca de establo (*Stomoxys calcitrans*) y la mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*); lo que ha permitido la propagación de la infección y el mantenimiento del parásito en ausencia de su vector biológico (Muita et al., 2025; Zapata et al., 2017). La eficacia de este mecanismo depende directamente de la parasitemia de los hospedadores vertebrados y el número y frecuencia de las picaduras (Desquesnes et al., 2022).

Además, se ha documentado la detección de *T. vivax* en garrapatas (*Rhipicephalus (Boophilus*) *microplus* y *Amblyomma cajennense)* y en piojos hematófagos (*Haematopinus*

tuberculatus), aunque su papel en la transmisión aún se desconoce (Bolívar, 2013; Dyonisio et al., 2021).

También se ha descrito la transmisión iatrogénica, asociada al uso compartido de agujas, jeringas o instrumentos de manejo sin adecuada desinfección. En condiciones experimentales, se ha confirmado la infección mediante las vías intravenosa, intramuscular y subcutánea, con supervivencia del parásito en productos veterinarios inyectables incluso tras horas de almacenamiento (de Melo Junior et al., 2021).

Signos clínicos

El *Trypanosoma vivax* es un parásito vascular que causa patologías de leves a graves, los animales infectados varían desde una infección crónica asintomática hasta una enfermedad altamente debilitante con alteraciones hematológicas, signos neurológicos y muerte; dependiendo de factores asociados al parásito y al hospedador, como la inmunidad y la condición corporal (Ventura et al., 2001; De Andrade Neto et al., 2019). En la tripanosomiasis se reconocen tres periodos (Gonzatti et al., 2014).

Periodo prepatente. Durante este periodo no se observan manifestaciones clínicas de la enfermedad, este comienza con la transmisión del parásito por el vector y termina en el momento en que se detectan los parásitos en la sangre del animal. La duración de este período se correlaciona con la carga parasitaria en el inóculo y la virulencia de la cepa (De Andrade Neto et al., 2019).

Periodo agudo. Este periodo comienza con la aparición de parásitos en la sangre y puede durar hasta 2-3 meses. En la fase inicial, uno de los primeros signos de colonización es el aumento de la temperatura. La recurrencia de la fiebre es característica y coincide con las oleadas de parasitemia que se observan a menudo cada 8-15 días. Durante este periodo se observa un

descenso drástico de los eritrocitos en circulación, lo que provoca una anemia moderada o grave. Otros signos característicos de este periodo son el lagrimeo, el edema submandibular, las secreciones nasales, la pérdida progresiva de peso, el letargo y la disminución de la producción de leche (De Andrade Neto et al., 2019). La tasa de mortalidad varía significativamente, entre el 3 % y el 50 %, dependiendo del aislado, el grado de estrés del huésped, la raza y la especie (Gonzatti et al., 2014).

Durante este periodo aparecen alteraciones reproductivas graves tanto en machos como en hembras. En los machos se produce una inhibición total de la espermatogénesis, con degeneración testicular que conduce a la infertilidad (De Andrade Neto et al., 2019). En las hembras genera lesiones genitales graves, anestro transitorio o permanente, ciclos estrales anormales y una mayor incidencia de abortos (Rodrigues et al., 2013).

Periodo crónico. Este periodo se da dos o tres meses después de la infección, cuando los animales que han sobrevivido a la fase aguda mantienen una parasitemia, luego comenzarán a recuperar los parámetros sanguíneos normales y parecerán asintomáticos. Sin embargo, diferentes tipos de estrés (escasez de alimentos, sequía, etc.) provocarán la reaparición de la parasitemia y, por ende, el retorno de los signos clínicos del período agudo (Gonzatti et al., 2014).

Diagnóstico

La tripanosomiasis causada por *T. vivax* se diagnostica mediante una combinación de técnicas clínicas, parasitológicas, serológicas y moleculares (Desquesnes et al., 2022).

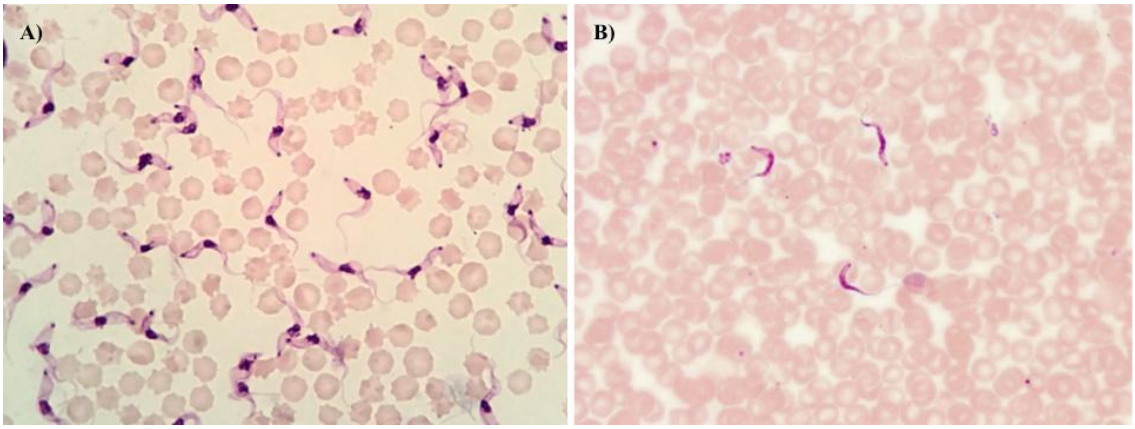
Diagnóstico clínico. Se basa en varios signos, entre los que se incluyen: fiebre recurrente, anemia evidenciada por palidez de las membranas mucosas (vulvar, ocular o gingival); lagrimeo, pérdida general del estado físico, caquexia, y una disminución evidente de la

productividad, medida por la producción de leche y/o la tasa de aumento de peso (Gonzatti et al., 2014).

Diagnóstico parasitológico. Es el método más utilizado para identificar *T. vivax* en el campo. Se pueden utilizar varias técnicas de detección directa de parásitos basadas en el examen microscópico; clasificadas de menor a mayor sensibilidad, estas incluyen, primero el examen microscópico de frotis de sangre fresca; segundo el frotis de sangre fina teñido con Giemsa, que permite la identificación a nivel de subgénero basándose en la morfología del parásito (Figura 4); tercero, la técnica de concentración del hematocrito, que utiliza un tubo capilar, o el método de Woo. Por último, el método de la capa leucocitaria (Desquesnes et al., 2022; Castelli et al., 2021). Estas técnicas parasitológicas tienen una baja especificidad y sensibilidad, especialmente cuando la carga parasitaria es baja (Desqusnes et al., 2022).

Figura 4

Frotis Sanguíneo con Trypanosoma vivax



Nota. Tinción con Giemsa. A) Observado a 1000X. Tomado de Bastos et al., 2017. B) Tripomastigote de gran tamaño (20-27 µm), flagelo libre, gran cinetoplasto terminal, núcleo central y gran membrana ondulante. Tomado de Desquesnes et al., 2022.

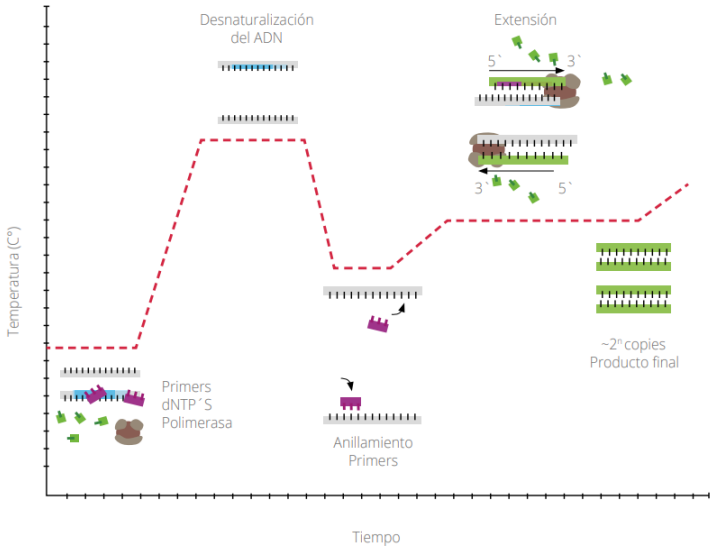
Diagnóstico serológico. Se realiza mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). El ELISA indirecto es un ensayo sencillo y eficaz que puede utilizarse para cuantificar la presencia de anticuerpos en un

gran número de muestras (Desquesnes et al., 2022). Esta técnica se ha utilizado con extractos crudos de *T. vivax* para diagnosticar animales en las fases aguda y crónica de la enfermedad y para determinar la seroprevalencia de la tripanosomiasis (Cadioli et al. 2012).

Diagnóstico molecular. El diagnóstico molecular basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha consolidado como una herramienta esencial para la detección de *Trypanosoma vivax* en bovinos y búfalos, especialmente en casos de parasitemia baja donde los métodos parasitológicos presentan sensibilidad limitada (Desquesnes et al., 2017). La técnica permite amplificar regiones específicas del ADN del parásito mediante ciclos sucesivos de desnaturalización, anillamiento y extensión (Figura 5), utilizando cebadores diseñados para reconocer secuencias blanco del genoma de *T. vivax* (Castro-Rojas et al., 2023). Los elementos importantes en la reacción son el ADN, la enzima polimerasa, los cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), el ión magnesio (Mg +), el buffer y H_2O de grado molecular (Tamay et al., 2013).

Figura 5

Etapas en el Ciclo de Amplificación



Nota. Tomado de Castro Castro-Rojas et al., 2023.

Diversos marcadores moleculares han sido empleados para el diagnóstico de *T. vivax*. Uno de los más utilizados es la región mini-exón o spliced leader (SL), altamente conservada y presente en copias múltiples, lo que incrementa la sensibilidad de detección. Ventura et al. (2001) desarrollaron los cebadores TviSL15/25, ampliamente aplicados en bovinos y búfalos, con amplificaciones esperadas de 210 pb, y demostraron su utilidad en infecciones naturales y experimentales.

Otro marcador empleado corresponde a un fragmento del gen ILDat 1.2, que codifica un antígeno diagnóstico. Los cebadores ILO1264/1265, diseñados por Masake et al. (1997), han sido utilizados en estudios epidemiológicos en rumiantes de regiones endémicas, mostrando alta sensibilidad para *T. vivax* y permitiendo detección en fases subclínicas. Su aplicación en búfalos ha sido reportada en estudios de prevalencia en África Occidental y América Latina, donde su desempeño supera a técnicas tradicionales como el microhematocrito centrifugado (Fetene et al., 2021).

Asimismo, Cortez et al. (2009) desarrollaron los cebadores TviCatL/DTO155, dirigidos al gen Cathepsin L-like, perteneciente a una familia multigénica involucrada en procesos de invasión y evasión inmunitaria. Este marcador ha sido utilizado para caracterizar infecciones por *T. vivax* en bovinos y para diferenciar especies del subgénero *Duttonella*.

Capítulo III

Materiales y métodos

Población y área de estudio

Se trabajó con una población de 15 búfalas de agua (*Bubalus bubalis*) hembras, sin restricción de edad, pertenecientes al cruce Murrah x Mediterráneo. El muestreo se realizó en septiembre en la Granja Experimental Villa Marina (N 7°32′.010″, W 72°38′.167″), ubicada en el municipio de Pamplonita, Norte de Santander, Colombia.

Toma de muestra

Se colectaron 15 muestras sanguíneas mediante punción de la vena coccígea, utilizando el sistema Vacutainer® y tubos con anticoagulante EDTA (Figura 6-B). Adicionalmente, se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena marginal auricular para la preparación de frotis sanguíneos. Estas láminas fueron fijadas en alcohol al 70%, almacenadas para su tinción y observación microscópica en el laboratorio de la Universidade Federal dos vales do Jequitinhonha e Mucurí, Brasil. Las láminas fueron llevadas por la docente Vivian Ferreira Zadra, quien visitó la Universidad de Pamplona a través del Programa de Intercambio Académico Latinoamericano (PILA).

Parámetros fisiológicos

Se registraron para cada animal (búfalos con códigos del VM1 al VM15) los siguientes parámetros: condición corporal (CC) en escala de 1 a 5, coloración de mucosas, retorno del pliegue cutáneo (RPC), tiempo de llenado capilar (TLC), temperatura rectal, frecuencia cardiaca (FC), frecuencia respiratoria (FR) y antecedentes clínicos y reproductivos reportados por el médico veterinario a cargo (Figura 6-C). Todos los datos fueron registrados en planillas individuales para análisis comparativo.

Figura 6

Muestreo Búfalos



Nota. A. Búfalos de Villa Marina, B. Muestreo en vena coccígea con Vacutainer®, C. Toma de parámetros fisiológicos. Fuente propia.

Micro hematocrito

La evaluación del hematocrito se realizó utilizando micro capilares heparinizados llenados con sangre completa. Los capilares fueron sellados y centrifugados siguiendo el procedimiento estándar para micro hematocrito. La lectura se efectuó manualmente mediante regla lectora, determinando el porcentaje de eritrocitos frente al volumen total de sangre.

Evaluación microscópica

Además de las muestras colectadas en el presente estudio, se incluyeron en el análisis frotis sanguíneos previamente obtenidos y teñidos en el laboratorio CEDIMOL, correspondientes

a un muestreo realizado en junio en la Granja Experimental Villa Marina (Muestras del VM16 al VM25). La lectura microscópica fue realizada utilizando un microscopio óptico con objetivo de inmersión 100×.

Extracción y cuantificación de ADN

El ADN genómico de las muestras sanguíneas se obtuvo a partir de 200 µL de sangre total utilizando el kit InviSorb® (Invitek Diagnostics), un sistema basado en membrana de sílice para la purificación de ADN. El protocolo incluyó la lisis celular, la unión del ADN a la matriz, los lavados para eliminar impurezas y la elución final en buffer libre de nucleasas. Las muestras se almacenaron a −20 °C hasta su procesamiento. La cuantificación y calidad del ADN se evaluaron mediante espectrofotometría de luz ultravioleta utilizando un NanoDrop® (Thermo Scientific™).

Revisión bioinformática de cebadores

Se emplearon tres pares de cebadores dirigidos a regiones específicas de *Trypanosoma vivax*. Antes de su utilización en la PCR, sus secuencias fueron evaluadas mediante la Herramienta Básica de Búsqueda de Alineamiento Local (BLAST, por sus siglas en inglés), con el fin de confirmar su especificidad frente al parásito y descartar posibles amplificaciones inespecíficas. En la Tabla 1 se presentan las secuencias de los cebadores, el tamaño esperado del producto y las condiciones de PCR.

Tabla 1

Cebadores y Condiciones de PCR

Cebadores	Secuencias	Producto esperado	Condición PCR
TviSL15/25 (Ventura et al., 2001)	F 5'-GCTCTCCAATCTTAACCCTA-3'; R 5'-GTTCCAGGCGTGCAAACGTC-3'	210 pb	1' a 94°C, 30 ciclos: [30" a 94°C, 1' a 55°C, 2' a 72°C] y 10' a 72°C

ILO1264/65 (Masake et al., 1997)	F 5'-CAGCTCGGCGAAGGCCACTTGGCTGGG-3'; R 5'-TCGCTACCACAGTCGCAATCGTCGTCTCAAGG-3'	400 pb	5' a 94°C, 35 ciclos: [1.5' a 94°C, 1.5' a 55°C, 1.5' a 72°C] y 10' a 72°C
TviCatL/DTO 155 (Cortez et al., 2009)	F 5'-GCCATCGCCAAGTACCTCGCCGA-3'; R 5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA-3'	177 pb	5' a 94°C, 35 ciclos: [1' a 94°C, 1' a 65°C, 1' a 72°C] y 10' a 72°C

Conformación de pools de ADN

Para complementar el análisis molecular, además de las 15 muestras sanguíneas recolectadas en septiembre, se incorporaron 10 muestras adicionales de ADN previamente extraído a partir de sangre completa, correspondientes a un muestreo realizado en junio en la Granja Experimental Villa Marina. Estas muestras se encontraban almacenadas a −20 °C en el laboratorio CEDIMOL y fueron incluidas con el fin de ampliar el número total de individuos evaluados mediante PCR.

Con el objetivo de optimizar el uso de reactivos y facilitar la evaluación preliminar de la presencia del parásito, todas las muestras de ADN fueron organizadas en pools antes de proceder a las amplificaciones individuales. La conformación de cada pool, así como el origen de las muestras, se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2

Conformación de Pools de ADN Utilizados en los Ensayos de PCR

Pool	Muestras incluidas	Origen
1	VM1, VM2, VM3, VM4	Septiembre
2	VM5, VM6, VM7, VM8	Septiembre
3	VM9, VM10, VM11, VM12	Septiembre

4	VM13, VM14, VM15	Septiembre
5	VM16, VM17, VM18, VM19, VM20	Junio
6	VM21, VM22, VM23, VM24, VM25	Junio

Nota. Todas las muestras son del año 2025. VM = código asignado a cada búfala de la Granja Experimental Villa Marina.

Amplificación por PCR

Las reacciones se prepararon en un volumen final de 25 µL, utilizando 12.5 µL del Master Mix NZYTaq II Green 2× (ADN polimerasa, dNTPs, $MgCl_2$ a 2.5 mM y tampón de reacción). A cada mezcla se añadieron 2,5 µL (20pmol) de cada cebador. Finalmente, se incorporaron 5 µL de ADN y 2,5 µL de agua libre de nucleasas para completar el volumen final.

Para cada par de cebadores se establecieron condiciones específicas en la técnica de PCR, los cuales son mostrados en la Tabla 1.

Los productos amplificados se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, empleando tampón TBE (Tris-borato-EDTA) y 7 µL de colorante HidraGreen™ Safe Loading Buffer. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (BioLabs®). La corrida se realizó a 80 V durante 90 minutos y la visualización se llevó a cabo en transiluminador UV Invitrogen™ Safe Imager™ 2.0.

Capítulo IV

Resultados

Parámetros fisiológicos y micro hematocrito

En las 15 búfalas evaluadas, la frecuencia cardiaca promedio fue 48,7 latidos/min (rango 44–57), la frecuencia respiratoria osciló entre 24 y 39 respiraciones/min, la temperatura rectal promedio fue 38,2 °C (rango 36,7–39,7) y el hematocrito promedio fue 31,3 % (rango 27–36). Se registraron seis animales con hematocrito por debajo del rango de referencia esperado y una

prevalencia de condición corporal baja (≥2/5 en varios individuos). Los valores concretos por animal se consignan en la Tabla 3.

Entre los casos relevantes, la búfala VM13 presentó un hematocrito del 24 %, condición corporal 2/5, tiempo de llenado capilar mayor de 2 segundos, temperatura rectal de 36.7 °C y frecuencia respiratoria de 27 rpm. Además, registró un antecedente de aborto completo, con expulsión de un feto íntegro y placenta de aspecto macroscópico conservado, sin malformaciones ni signos de retención. Asimismo, presentó diarrea en pluma de color verde, sin olor ofensivo.

Tabla 3

Parámetros Fisiológicos y Micro Hematocrito Búfalas

Código Búfalas	Estado reproductivo	Parámetros Fisiológicos							Micro-Hematocrito (%)
		CC	Mm	RPC (seg)	TLLC (seg)	FC (lpm)	FR (rpm)	T (°C)	
VM1	Vacía	3/5	R	1	2	50	30	38.3	27
VM2	Gestante	4/5	R	<2	2	44	39	38.5	31
VM3	Lactante	3/5	R	2	2	50	28	38.7	32
VM4	Lactante	4/5	R	<2	<2	47	27	37.8	31
VM5	Lactante	3/5	R	<2	<2	44	24	38.1	36
VM6	Gestante	4/5	R	<2	<2	51	31	39.7	30
VM7	Vacía	4/5	R	<2	<2	49	36	38.3	35
VM8	Vacía	3/5	RP	2	<2	47	24	37.4	33
VM9	Gestante	3.5/5	RP	2	<2	57	36	38.3	30
VM10	Lactante	2.8/5	RP	2	3	51	39	37.9	35
VM11	Gestante	4/5	R	<2	<2	55	36	39.1	33
VM12	Vacía	3.5/5	RP	<2	<2	47	37	38.1	34
VM13	Vacía	2/5	RP	2	>2	47	27	36.7	24
VM14	Vacía	2.5/5	RP	2	<2	49	37	38.4	30

VM15	Vacía	4/5	R	<2	<2	52	32	38.9	29

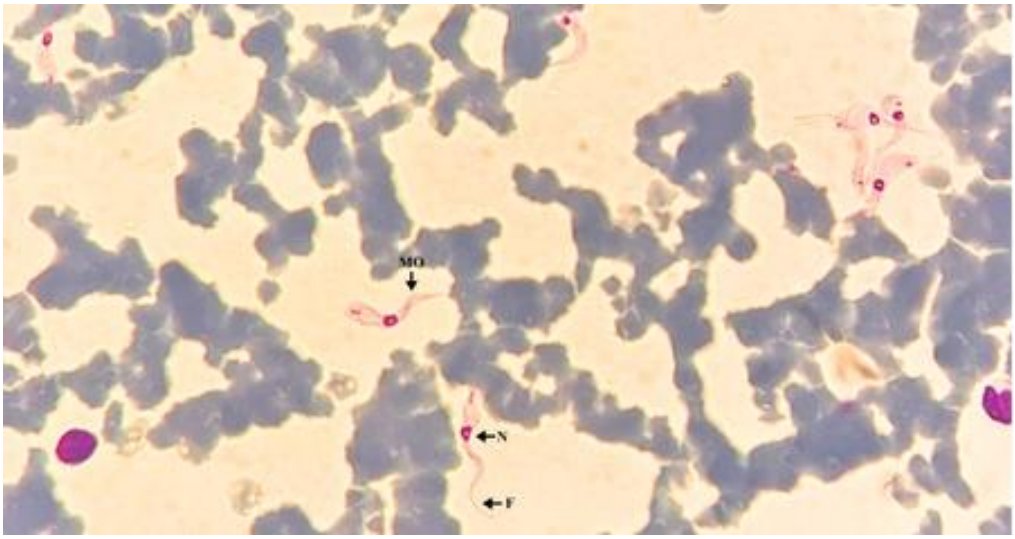
Nota. Valores registrados del muestreo en septiembre. CC: Condición corporal, Mm: coloración membranas mucosas, RPC: Retorno del pliegue cutáneo, TLLC: Tiempo de llenado capilar, FC: Frecuencia cardiaca, FR: Frecuencia respiratoria, T: Temperatura rectal, RP: Rosado pálido, R: Rosado.

Evaluación microscópica

Al examinar los extendidos sanguíneos, en la muestra VM20 se observaron formas tripomastigotes compatibles con *Trypanosoma spp*. en donde se identificó el núcleo, el flagelo y la membrana ondulante característica (Figura 7). En las demás muestras no se evidenciaron estructuras parasitarias (Anexo 1).

Figura 7

Frotis Sanguíneo de la Muestra VM20



Nota. MO: Membrana ondulante, N: Núcleo, F: Flagelo. 100× inmersión.

Dado lo anterior, VM20 fue considerada como un control morfológico positivo, empleado como referencia comparativa frente a los resultados moleculares.

Revisión bioinformática de cebadores

Se realizó el análisis de alineamiento mediante BLAST para evaluar la especificidad molecular de los cebadores TviSL15/25, ILO1264/1265 y TviCatL/DTO155. Los cebadores

TviSL15/25 mostraron un alineamiento directo con la región mini-exón (SL) de *Trypanosoma vivax*, con valores de identidad superiores al 98% y coberturas (consulta) del 100%, confirmando su especificidad (Anexo 2 y Anexo 3)

Los cebadores ILO1264/1265 se alinearon específicamente con un fragmento del gen ILDat 1.2 (antígeno diagnóstico), obteniendo valores de identidad del 100% y coberturas del 100%. Aunque se detectaron alineamientos secundarios con secuencias bacterianas, estos presentaron identidades y coberturas menores, lo cual sugiere que no comprometen la especificidad en condiciones biológicas de PCR (Anexo 4 y Anexo 5).

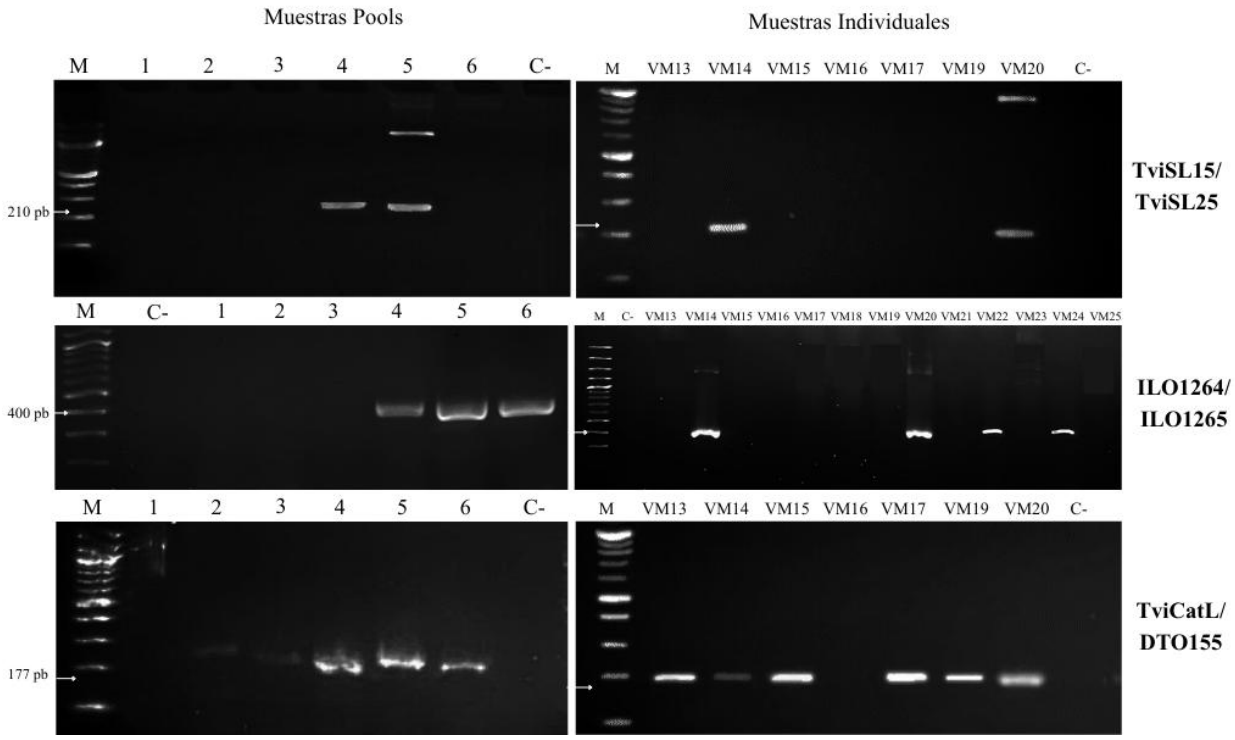
En el caso de los cebadores TviCatL/DTO155, se obtuvo un alineamiento con el gen Cathepsin L-like, con un 100% de identidad y una cobertura completa, aunque con valores de E-value más altos (0.070 y 0.025), indicando una menor significancia estadística del alineamiento (Anexo 6 y Anexo 7).

Técnica de PCR

Para cada par de cebadores se realizaron dos ensayos: uno empleando los seis pools de ADN y otro utilizando muestras individuales seleccionadas según los resultados obtenidos en dichos pools (Figura 8).

Figura 8

Amplificados por PCR de Muestra de Villa Marina



Nota. Amplificación de 210pb corresponde a los cebadores TviSL12/25, de 400 pb a ILO1264/1265 y de 177 pb a TviCatL/DTO155. M: marcador molecular. C-: control negativo.

Cebadores TviSL15/25

Los productos amplificados a partir de las muestras agrupadas mostraron señales específicas únicamente en los grupos correspondientes a Pool 4 y Pool 5. En la evaluación individual de las muestras asociadas se evidenció amplificación en VM14 y VM20.

Cebadores ILO1264/1265

En las amplificaciones realizadas a partir de muestras agrupadas mostraron señales especificas en el Pool 4, Pool 5 y Pool 6. El análisis individual identificó un producto del tamaño esperado (400 pb) en las muestras VM14, VM20, VM22, VM24.

Cebadores TviCatL/DTO155

Las amplificaciones obtenidas a partir de muestras agrupadas mostraron productos superiores al rango esperado (~200–250 pb), clasificándose como no específicos. En las

reacciones individuales se observaron productos en VM13, VM14, VM15, VM17, VM19 y VM20; sin embargo, estos también se localizaron por encima del rango esperado, por lo que se consideraron señales ambiguas sin valor confirmatorio para *T. vivax*.

Con el fin de analizar la correspondencia entre los resultados obtenidos con los diferentes pares de cebadores, se presenta una tabla con las muestras positivas y negativas (Tabla 4).

Tabla 4

Muestras Positivas por Par de Cebadores Empleados

Muestra	TviSL15/25 (210 pb)	TviCatL/DTO155 (177 pb)	ILO1264/1265 (400 pb)
VM13	–	–	–
VM14	+	–	+
VM15	–	–	–
VM16	–	–	–
VM17	–	–	–
VM19	–	–	–
VM20	+	–	+
VM21	–	–	–
VM22	–	–	+
VM23	–	–	–
VM24	–	–	+
VM25	–	–	–

Nota. (+) Amplificación detectada en la banda esperada; (–) ausencia de amplificación detectable.

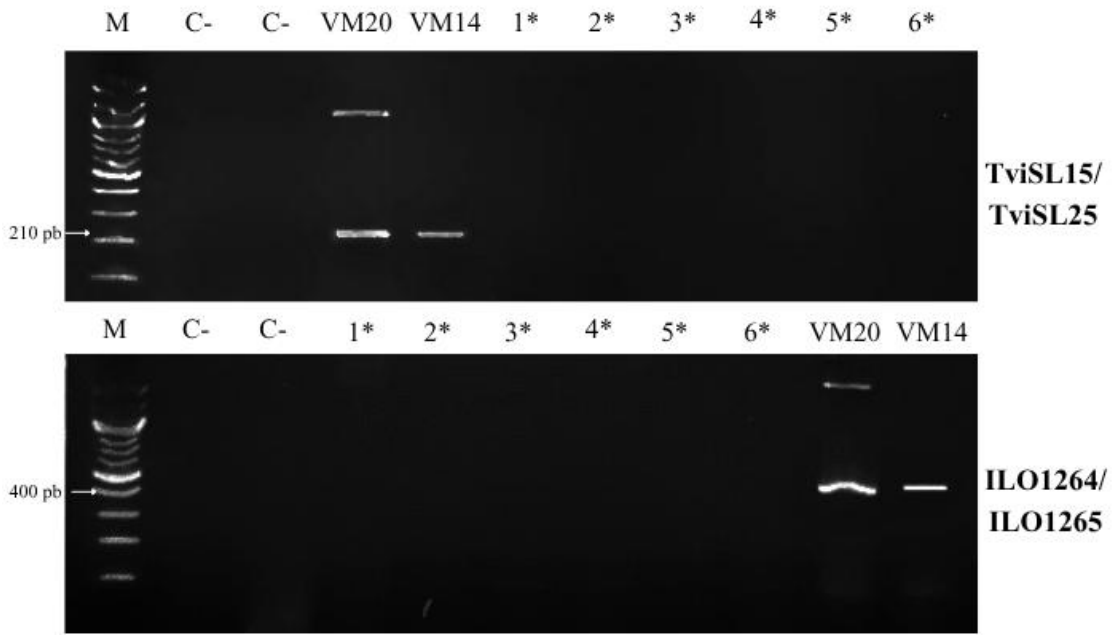
Ensayo complementario de verificación de especificidad

Con el fin de corroborar la especificidad de los cebadores utilizados, se evaluaron adicionalmente muestras de ADN provenientes de búfalos del Magdalena Medio, las cuales habían sido reportadas previamente como positivas para *Trypanosoma evansi*. Para este ensayo se emplearon los cebadores TviSL15/25 y ILO1264/1265, utilizando como controles positivos

las muestras VM14 y VM20. Las muestras del Magdalena Medio no presentaron amplificación con ninguno de los dos pares de cebadores, mientras que los controles positivos mostraron bandas definidas en los tamaños esperados (Figura 9).

Figura 9

Amplificación por PCR de Muestras del Magdalena Medio



Nota. M: marcador molecular. C-: control negativo. Las muestras del 1* al 6* son del Magdalena Medio Las muestras VM20 Y VM14 se utilizaron como controles positivos.

Discusión

La evaluación de los búfalos de la Granja Experimental Villa Marina permitió integrar resultados clínicos, hematológicos y moleculares orientados a determinar la posible presencia de *Trypanosoma vivax* en la población estudiada. Los valores fisiológicos registrados presentaron ligeras variaciones especialmente en la frecuencia respiratoria y, en menor medida, la frecuencia cardiaca. Estas pequeñas variaciones se han documentado en búfalos sometidos a altas temperaturas ambientales especialmente durante las horas centrales del día, como efecto termorregulador (Pereira et al., 2020; Mishra, 2021).

En relación con la temperatura rectal, el promedio de 38,2 °C se encuentra dentro de los rangos fisiológicos descritos para la especie, que oscilan entre 37,5 y 39 °C (Londoño et al., 2012; Silveira et al., 2016). Respecto a la condición corporal, varias búfalas presentaron puntuaciones bajas, un hallazgo concordante con lo descrito en animales infectados por *Trypanosoma spp.* Diversos estudios han documentado que tanto búfalos como bovinos positivos a tripanosomiasis muestran una reducción progresiva de la condición corporal, incluso cuando los signos clínicos son poco específicos (Zapata et al., 2009; Calderón et al., 2016).

La disminución de la condición corporal en los animales infectados con *Trypanosoma vivax* se relaciona principalmente con la pérdida progresiva de peso, la cual ocurre en asociación directa con altos niveles de parasitemia y con la presencia de anemia (Batista et al., 2009).

Los cambios en el peso corporal, ya sea ganancia o pérdida, están fuertemente influenciados por el nivel de ingesta proteica. Una dieta con suficiente proteína permite que los animales infectados mantengan tasas de crecimiento similares a las de animales sanos, siempre que la ingesta energética también sea adecuada. Por el contrario, cuando la ingesta de energía es insuficiente, los efectos adversos de la tripanosomiasis sobre el peso corporal se intensifican, favoreciendo un adelgazamiento más marcado (Holmes et al., 2000).

El hematocrito presentó un promedio del 31,3% (27 a 36%), valores que se ubican en el límite inferior o por debajo de los rangos fisiológicos reportados para la especie 31,6–35% (Londoño et al., 2012; Rodrigues et al., 2011). Este parámetro puede verse influenciado por diversos factores fisiológicos y ambientales; entre las causas de disminución se incluyen la lactancia y el posparto inmediato, etapas en las que se ha descrito una reducción progresiva del hematocrito, especialmente durante el inicio y la mitad del periodo de lactancia (Oliveira et al., 2003). Asimismo, las altas temperaturas ambientales favorecen a la vasodilatación y a las

alteraciones hidroelectrolíticas que pueden contribuir a la disminución del hematocrito (Pereira et al., 2020). No obstante, la anemia también es un hallazgo característico de patologías hemo parasitarias como la tripanosomiasis.

En un estudio donde analizaron el hematocrito en búfalos que presentaban *Trypanosoma spp*. en frotis sanguíneo, obtuvieron un rango de 15 a 20% (Linhares et al., 2006). Cuglovici et al. (2010), observaron una variación del hematocrito del 11 % al 38 %, con una gran proporción de animales positivos que presentaban valores inferiores al 24 %. Sin embargo, estos hallazgos contradicen los reportados por Jaramillo et al. (2023) y Fidelis et al. (2016), quienes no encontraron alteraciones en los valores de hematocrito en bufalinos infectados naturalmente por *Trypanosoma vivax.*

No obstante, este comportamiento clínico concuerda con lo reportado en infecciones crónicas por *Trypanosoma vivax*, en las cuales los signos suelen ser poco específicos o progresivos, reflejando una respuesta inmunitaria del hospedero capaz de reducir transitoriamente la parasitemia, sin eliminar completamente la infección (Dyonisio et al., 2021; Castelli et al., 2021).

En particular, el caso de la búfala VM13, con un hematocrito del 24%, por debajo del rango fisiológico esperado; condición corporal reducida y antecedente de aborto; presenta un cuadro crónico compatible con tripanosomiasis. La anemia es uno de los hallazgos más consistentes en la enfermedad y se relaciona tanto con hemólisis inmunomediada como con alteraciones en la eritropoyesis asociada a la inflamación (Giordani et al., 2016; Ventura et al., 2001). Sin embargo, a pesar de este patrón clínico y hematológico sugestivo, las pruebas de PCR no confirmaron la presencia del parásito en esta búfala, lo que abre la posibilidad de una parasitemia baja, fase crónica avanzada o incluso la infección por otra especie, particularmente

T. evansi, la cual ha sido reportada previamente en la región (Arias y Román, 2019; Zapata et al., 2009).

Un estudio realizado entre 2014 y 2016 en Antioquia y Arauca, sobre la prevalencia mediante análisis molecular de *Trypanosoma spp*. en bovinos y búfalos dio como resultados en bovinos una prevalencia de 39,2%, siendo un 38,6% *T. theileri, 6,7% T. evansi,* 0,2% *T. vivax;* y en búfalos la prevalencia fue de 28,2%, con *T. theileri* 28,2% y *T. evansi* 1,3% (Jaimes et al., 2018).

La evaluación microscópica permitió identificar la presencia de un tripomastigote compatible con *Trypanosoma spp.* en la muestra VM20. Aunque la tinción de Giemsa es un método ampliamente utilizado; sin embargo, su sensibilidad es limitada en condiciones de parasitemia baja, situación frecuente en infecciones crónicas o subclínicas *(*Desquesnes et al., 2017; Rodrigues et al., 2019*).* No obstante, la morfología no permite diferenciar las especies del género *Trypanosoma*; por ello, la confirmación molecular mediante PCR resulta indispensable para establecer la identidad del parásito *(*Ventura et al., 2001; Cortez et al., 2009*)*. En este trabajo, el diagnóstico molecular permitió confirmar la presencia de *Trypanosoma vivax* en esta muestra.

Dado que VM20 exhibió tripomastigotes en el extendido sanguíneo esta muestra funcionó como un control positivo morfológico, al contar con un animal naturalmente infectado permitió comparar el desempeño de los diferentes cebadores en condiciones reales de parasitemia. El uso de muestras de campo confirmadas por dos metodologías independientes es una estrategia para validar la eficiencia de nuevos ensayos moleculares y verificar la integridad de reactivos *(*Desquesnes et al., 2009; Mitashi et al., 2012*).*

La comparación de los resultados obtenidos en este estudio con evaluaciones previas de distintos cebadores evidencia patrones consistentes en cuanto a sensibilidad y especificidad. Eleizalde et al. (2021), demostraron que los cebadores ILO1264/1265 se encuentran entre los más sensibles para la detección de *T. vivax*, con un desempeño superior al de TviSL15/25 y a otros pares evaluados. En concordancia con estos hallazgos, en el presente trabajo ILO1264/1265 amplificó el mayor número de muestras individuales (VM14, VM20, VM22 y VM24), superando el rendimiento observado con TviSL15/25, que únicamente detectó dos animales positivos. Además, Eleizalde et al. (2021), también reportaron una menor sensibilidad para cebadores que, como TviSL15/25, se dirigen a regiones con bajo número de copias genómicas, lo que coincide con la menor cantidad de amplificaciones obtenidas en este estudio.

En relación con los resultados obtenidos con el marcador TviCatL/DTO155, las bandas observadas por encima del tamaño esperado constituyen amplificaciones inespecíficas, un comportamiento identificado en PCR dirigidas a familias multigénicas (Ortiz et al., 2009). Los genes Cathepsin L–like en *Trypanosoma vivax* conforman un repertorio extenso de copias con alta similitud interna, pero con variaciones estructurales y de longitud que afectan la especificidad del anillamiento (Ortiz et al., 2009; Cortez et al., 2009). Esta diversidad facilita que los cebadores puedan hibridar no solo con la copia diana, sino también con variantes del mismo locus, pseudogenes o regiones parcialmente homólogas dentro del genoma, generando amplicones mayores o menores al esperado (Njiru et al., 2005; Mankandla et al., 2022). Estudios recientes que emplean CatL como blanco diagnóstico corroboran esta variabilidad inherente, señalando que los perfiles de amplificación pueden fluctuar según el origen geográfico, el linaje y la composición genómica del parásito (Mnkandla et al., 2022; Ortiz et al., 2009). De hecho, incluso investigaciones en las que el marcador CatL mostró un buen rendimiento reportaron la

presencia de bandas adicionales clasificadas como no específicas en las figuras suplementarias, lo que confirma que este patrón puede aparecer aún bajo condiciones experimentales optimizadas (Mossaad et al., 2017).

En este contexto, las bandas obtenidas en este estudio no pueden interpretarse como indicativas de infección por *T. vivax*, dado que no coinciden con el tamaño diagnóstico establecido para TviCatL (~177 pb) y podrían corresponder a copias alternas del locus CatL, fragmentos divergentes o secuencias relacionadas dentro de la misma familia génica (Mendoza et al., 2008; Kangussu et al., 2013). Por lo tanto, la confirmación del origen de estos productos requiere secuenciación del amplicón antes de cualquier interpretación diagnóstica. En conjunto, estos hallazgos no cuestionan la utilidad del marcador TviCatL/DTO155, cuya eficacia ha sido demostrada en múltiples estudios, sino que reflejan la complejidad molecular intrínseca de las familias multigénicas y resaltan la importancia de verificar mediante secuenciación cualquier banda que se desvíe del rango esperado para evitar interpretaciones diagnósticas erróneas (Gaithuma et al., 2019).

Se observaron variaciones en los parámetros fisiológicos y hematológicos entre los animales evaluados. La búfala VM14 resultó positiva en la PCR, esta presentó el valor del hematocrito reducido (35%) y condición corporal de 2.5/5. En contraste, con una búfala con signos clínicos marcados compatibles con tripanosomiasis que no mostró amplificación en ninguna de las pruebas de PCR realizadas (VM13). La ausencia de amplificación en una búfala con signos clínicos más evidentes demuestra que la parasitemia puede ser fluctuante y que, en fases crónicas, la detección molecular puede verse limitada, coincidiendo con lo reportado sobre la baja sensibilidad de PCR en cargas parasitarias reducidas (Dagnachew et al., 2015).

Asimismo, este hallazgo indica la importancia de incluir otras especies o agentes hemotrópicos como parte de los diagnósticos diferenciales

La comparación de muestras de Villa Marina con muestras provenientes del Magdalena Medio permitió revisar la posibilidad de una mala clasificación entre *T. vivax* y *T. evansi*. En la literatura colombiana existen registros de focos mixtos o sustitución temporal entre ambas especies, especialmente en regiones ganaderas con alta densidad de tábanos y elevada movilidad animal (Zapata et al., 2009; Barrientos et al., 2020). En este estudio, las muestras del Magdalena Medio que fueron consideradas previamente positivas para tripanosomiasis, resultaron negativas para *T. vivax* bajo los cebadores utilizados, lo que, en concordancia con los reportes previos, confirma la positividad a *T. evansi*. Este hallazgo destaca la importancia de seleccionar cebadores con alta especificidad y validar los resultados mediante análisis comparativo, dado que ciertas regiones génicas son compartidas o conservadas entre especies del mismo subgénero, pudiendo generar interpretaciones diagnósticas erróneas (Jaimes-Dueñez et al., 2018; Barrientos et al., 2020).

Capítulo V

Conclusión

Los resultados obtenidos permiten integrar diversos aspectos clínicos, hematológicos y moleculares que orientan la interpretación final del estudio. Se evidenció que los cebadores ILO1264/1265 y TviSL15/25 presentan una especificidad bioinformática adecuada y un desempeño superior en la detección de *Trypanosoma vivax*, mientras que TviCatL/DTO155 mostró amplificaciones inespecíficas asociadas a la variabilidad del locus CatL, lo que limita su utilidad diagnóstica.

La comparación entre los pares de cebadores confirmó un mejor desempeño de ILO1264/1265 en muestras individuales, en contraste con la menor eficiencia de TviSL15/25 y la ausencia de productos diagnósticos reproducibles con TviCatL/DTO155.

La caracterización fisiológica y hematológica reveló animales con hematocrito disminuido y condición corporal reducida, indicadores compatibles con procesos hemotrópicos, aunque no siempre asociados con la detección molecular de *T. vivax*, sugiriendo posibles parasitemias bajas, infecciones crónicas o la presencia de otras especies como *T. evansi*.

En conjunto, estos hallazgos destacan la necesidad de integrar la información clínica, hematológica y molecular para un abordaje diagnóstico más preciso en búfalos y subrayan la importancia de seleccionar marcadores con alta especificidad en regiones donde coexisten múltiples tripanosomas.

Recomendaciones

En el ámbito productivo y sanitario de la Granja Experimental Villa Marina, se recomienda establecer un monitoreo periódico de los parámetros fisiológicos y hematológicos de los búfalos, con especial atención a aquellos animales que presenten disminución en la condición

corporal y signos compatibles con anemia. Dado que la tripanosomiasis puede cursar con parasitemias fluctuantes, se sugiere repetir las evaluaciones moleculares en distintos momentos, particularmente en animales clínicamente sospechosos que resultaron negativos en primera instancia. Asimismo, considerando la presencia documentada de *Trypanosoma evansi* en la región, se recomienda incluir pruebas diagnósticas específicas para esta especie dentro del protocolo rutinario, con el fin de fortalecer el diagnóstico diferencial.

En relación con las herramientas moleculares, se aconseja priorizar el uso del par de cebadores ILO1264/1265, dado su mayor rendimiento y sensibilidad en muestras individuales, especialmente en contextos donde se sospechen parasitemias bajas. De igual manera, debe considerarse la posibilidad de infecciones mixtas *por T. vivax, T. evansi* u otros hemoparásitos presentes en sistemas de producción. Finalmente, se recomienda intensificar las medidas de control de vectores mecánicos, como tábanos y moscas hematófagas, mediante estrategias integradas de manejo de potreros, reducción de zonas húmedas que favorezcan la proliferación de insectos y uso estratégico de repelentes.

Referencias

Agudelo M., Mogollón, J., Torres, L., Peña, N. y Barrera, J. (1984). Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de Villavicencio por pruebas parasitológicas directas y por inmunofluorescencia indirecta. *Instituto Colombiano Agropecuario – ICA.* http://hdl.handle.net/20.500.12324/23334

Arias, L. y Román, M. (2019). *Identificación de hemoparásitos (Trypanosoma spp, Babesia spp, Anaplasma spp) en búfalos (Bubalus bubalis) en el departamento de Córdoba, Colombia.* [Trabajo de grado – Universidad CES]. http://hdl.handle.net/10946/4657

Baral T. (2010). Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. *Journal of biomedicine & biotechnology.* https://doi.org/10.1155/2010/389153

Barrientos, S., Barona, J. y Santa, N. (2020). *Prevalencia de Trypanosoma evansi en búfalos de agua (Bubalus bubalis), coinfecciones y su relación con variables zoográficas y hallazgos paraclínicos en los departamentos de Antioquia, Córdoba y Sucre (Colombia).* [Trabajo de grado- Universidad CES]. http://hdl.handle.net/10946/4916

Batista, J. S., Oliveira, A. F., Rodrigues, C. M., Damasceno, C. A., Oliveira, I. R., Alves, H. M., Paiva, E. S., Brito, P. D., Medeiros, J. M., Rodrigues, A. C., & Teixeira, M. M. (2009). Infection by Trypanosoma vivax in goats and sheep in the Brazilian semiarid region: from acute disease outbreak to chronic cryptic infection. *Veterinary parasitology*, 165(1-2), 131–135. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.005

Batista, J., Rodrigues, C., Olinda, R., Silva, T., Vale, R., Câmara, A., Rebouças, R., Bezerra, F., García, H., & Teixeira, M. (2012). Highly debilitating natural *Trypanosoma vivax* infections in Brazilian calves: epidemiology, pathology, and probable transplacental

transmission. *Parasitology research*, 110(1), 73–80. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2452-y

Bolívar, A. (2013). Detección de *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma vivax* en garrapatas de ganado bovino empleando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Eletrônica de Veterinária*. V. 14, n. 3. http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/38702

Cadioli, F., Barnabé, P., Machado, R., Teixeira, M., André, M., Sampaio, P., Fidélis Junior, O., Teixeira, M., & Marques, L. (2012). First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Brazilian journal of veterinary parasitology,* 21(2), 118–124. https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000200009

Calderón, A, Martinez, N y Iguarán, H. (2016). Frecuencia de hematozoarios en bovinos de una región del caribe colombiano. *Revista UDCA: Actualidad & Divulgación Científica* Vol. 19, No. 1. https://doi.org/10.31910/rudca.v19.n1.2016.118

Carvajal, A. (2019). *Tripanosomiasis bovina y su importancia en la reproducción en bovinos*. [Trabajo de grado- Universidad Cooperativa de Colombia]. https://hdl.handle.net/20.500.12494/14621

Castelli, G., da Silva, R., da Costa, A., & Marcili, A. (2021). *Trypanosoma vivax*: uma breve revisão / *Trypanosoma vivax*: a brief review. *Brazilian Journal of Development*, 7(11), 109155–109171. https://doi.org/10.34117/bjdv7n11-510

Castro-Rojas, C., Tere-Peña, C., Arias-Cortés, M. y otros. (2023). Guía para el aseguramiento de la validez de las mediciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Bogotá DC. *Colombia: Instituto Nacional de Metrología*. 132 pp.

Cortez, A., Rodrigues, A., Garcia, H., Neves, L., Batista, J., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South

America--characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and cellular probes*, 23(1), 44–51. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003

Cuglovici, D., Bartholomeu, D., Reis-Cunha, J., Carvalho, A., & Ribeiro, M. (2010). Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary parasitology*, 169(3-4), 320–326. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.041

Dagnachew, S., Bezie, M., Terefe, G., Abebe, G., Barry, J. & Goddeeris, B. (2015) Comparative clinico-haematological analysis in young Zebu cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of *Northwest Ethiopia*. *Acta Vet Scand* 57, 24. https://doi.org/10.1186/s13028-015-0114-2

De Andrade Neto, A., de Mendonça, C., de Souto, R., Sampaio, P., Junior, O., André, M., Machado, R., & Afonso, J. (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

De Melo Junior, R., Azeredo, T., Heller, L., Couto, L., Zapa, D., de Assis Cavalcante, A., Cruvinel, L., Nicaretta, J., Iuasse, H., Ferreira, L., Soares, V., Lino, G., Cadioli, F. & Lopes, W. (2022). How many cattle can be infected by *Trypanosoma vivax* by reusing the same needle and syringe, and what is the viability time of this protozoan in injectable veterinary products? *Parasitology*, 149(2), 270–282. doi:10.1017/S003118202100175X

Desquesnes, M. Bengaly, Z., Berthier, D., Bossard, G., Cene, B., Ilboudo, H., Jamonneau, V., Kaboré, J., Mémé, Y., Millogo, L., Ravel, S., Sakandé, H., Sanogo, L., Thévenon, S.,

Yoni, W. and Zoungrana, A. (2017). Compendium of standard Diagnostic protocols for Animal trypanosomoses of african origin. *CIRAD; OIE*, 106 p.

Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazmand, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., Gimonneau, G., Truc. P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Jamonneau, V., Jittapalapong, S., Jacquiet, P., Solano, P. & Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites Vectors* 15, 64. https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1

Dyonisio, G., Batista, H., da Silva, R., Azevedo, R., Costa, J., Manhães, I., Tonhosolo, R., Gennari, S., Minervino, A., & Marcili, A. (2021). Molecular Diagnosis and Prevalence of *Trypanosoma vivax* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) in Buffaloes and Ectoparasites in the Brazilian Amazon Region. *Journal of medical entomology*, 58(1), 403–407. https://doi.org/10.1093/jme/tjaa145

Eleizalde, M., Gómez-Piñeres, E., Ramírez-Iglesias, J., & Mendoza, M. (2021). Evaluation of five primer sets for molecular detection of *Trypanosoma vivax* by polymerase chain reaction (PCR) and their implementation for diagnosis in naturally infected ruminants from Venezuela. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 25, 100594. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100594

Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax:* a systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors*, 14(1), 80. https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x

Fidelis, O., Sampaio, P., Machado, R., André, M., Marques, L., & Cadioli, F. (2016). Evaluation of clinical signs, parasitemia, hematologic and biochemical changes in cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Brazilian journal of veterinary*

parasitology: *Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 25(1), 69–81. https://doi.org/10.1590/S1984-29612016013

Gaithuma, A., Yamagishi, J., Martinelli, A., Hayashida, K., Kawai, N., Marsela, M & Sugimoto, C. (2019) A single test approach for accurate and sensitive detection and taxonomic characterization of Trypanosomes by comprehensive analysis of internal transcribed spacer 1 amplicons. *PLoS Negl Trop Dis* 13(2): e0006842. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006842

Giordani, F., Morrison, L. J., Rowan, T. G., DE Koning, H. P., & Barrett, M. P. (2016). The animal trypanosomiases and their chemotherapy: a review. Parasitology, 143(14), 1862–1889. https://doi.org/10.1017/S0031182016001268

Gómez-Piñeres, E., Boada-Sucre, A., Bretaña, A., Contreras-Bretaña, M., García, F. y Reyna-Bello, A. (2014). Morfometría Comparativa de Cinco Aislados Venezolanos de *Trypanosoma vivax*. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV,* 55(1), 25-33.

Gonzatti, M., González-Baradat, B., Aso, P., Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Typanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: Magez, S., Radwanska, M. (eds) *Trypanosomes and Trypanosomiasis.* Springer, Vienna. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11

Holmes, P. H., Katunguka-Rwakishaya, E., Bennison, J. J., Wassink, G. J., & Parkins, J. J. (2000). Impact of nutrition on the pathophysiology of bovine trypanosomiasis. *Parasitology*, 120 Suppl, S73–S85. https://doi.org/10.1017/s0031182099005806

Jaimes, J., Triana, O., & Mejía, A. (2017). Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with

101 infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(2), 290–299. https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.12.002

Jaimes, J., Triana, O., & Mejía, A. (2018). Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma spp*. in cattle (Bos *taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary parasitology*, 249, 30–42. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004

Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. (2018). Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma spp*. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary parasitology*, 249, 30–42. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004

Jaramillo, I., Tobon, J., Agudelo, P., & Ruiz, J. D. (2023). Biochemical blood profile in water buffaloes: alterations related to natural infection by *Trypanosoma spp*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 70(1), 30-44. https://doi.org/10.15446/rfmvz.v70n1.102493

Jiménez, D. (2020). *Variables epidemiológicas de Trypanosoma sp. en un grupo de búfalos (Bubalus bubalis) en trece municipios en el Magdalena Medio colombiano*. [Trabajo de Pregrado, Universidad CES]. Repositorio CES. http://hdl.handle.net/10946/5039

Kangussu, M., de Paiva, R., Araújo, P., de Mendonça-Neto, R., Lemos, L., Bartholomeu, D., Mortara, R., daRocha, W., & Teixeira, S. (2013). Distinct genomic organization, mRNA expression and cellular localization of members of two amastin sub-families present in *Trypanosoma cruzi. BMC microbiology*, 13, 10. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-10

Linhares, G., Dias, F., Fernandes, P., & Duarte, S. (2006). Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins (relato de caso). *Ciência Animal Brasileira Brazilian Animal Science*, 7(4), 455–460. Recuperado de https://revistas.ufg.br/vet/article/view/876

Londoño C., Sánchez, E. & Prada, G. (2012). Parámetros fisiológicos y valores hematológicos normales en búfalos (*Bubalus bubalis*) del Magdalena Medio colombiano. *Revista De Medicina Veterinaria*, 23, 51-64. https://doi.org/10.19052/mv.74

Martinez, A., Carrascal, E., Doria, M., García, J., & Mejia, J. (2021). Analysis of economic losses due to diseases in the buffalo production system in the department of Córdoba, Colombia. *Ciencia Y Agricultura*, 18(2), 43–54. https://doi.org/10.19053/01228420.v18.n2.2021.12582

Masake, R., Majiwa, P., Moloo, S., Makau, J., Njuguna, J., Maina, M., Kabata, J., ole-MoiYoi, O., & Nantulya, V. (1997). Sensitive and specific detection of Trypanosoma vivax using the polymerase chain reaction. *Experimental parasitology*, 85(2), 193–205. https://doi.org/10.1006/expr.1996.4124

Mendoza, C., Biteau, N., Giroud, C., Coustou, V., Coetzer, T., Authié, E., Boulangé, A., & Baltz, T. (2008). Molecular and biochemical characterization of a cathepsin B-like protease family unique to *Trypanosoma congolense*. *Eukaryotic cell*, 7(4), 684–697. https://doi.org/10.1128/EC.00405-07

Mishra S. (2021). Thermoregulatory responses in riverine buffaloes against heat stress: An updated review. *Journal of thermal biology*, 96, 102844. https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102844

Mnkandla, S., Neves, L., Vorster, I., & Bhoora, R. (2022). Development of Cathepsin L-like Real-Time PCR Assays for the Detection of African Animal Trypanosomosis (AAT) in South Africa. *Pathogens*, 11(2), 136. https://doi.org/10.3390/pathogens11020136

Mossaad, E., Salim, B., Suganuma, K., Musinguzi, P., Hassan, M., Elamin, E., Mohammed, G., Bakhiet, A., Xuan, X., Satti, R., & Inoue, N. (2017) *Trypanosoma vivax* is the second leading cause of camel trypanosomosis in Sudan after *Trypanosoma evansi*. *Parasites Vectors* 10, 176 (2017). https://doi.org/10.1186/s13071-017-2117-5

Muita, J., Bargul, J., Makwatta, J., Ngatia, E., Tawich, S., Masiga, D., & Getahun, M. (2025) *Stomoxys* flies (*Diptera, Muscidae*) are competent vectors of *Trypanosoma evansi, Trypanosoma vivax*, and other livestock hemopathogens. *PLoS Pathog* 21(5): e1012570. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012570

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

Oliveira, C., Barbosa, J., Pfeifer, I. & Cardoso, D. (2003). Parâmetros sangüíneos e urinários, no pré e pós parto, de búfalas criadas em sistema exclusivo de pastejo. *Pesquisa Veterinária Brasileira 23* (2). https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000200006

Ortiz, P., Maia da Silva, F., Cortez, A., Lima, L., Campaner, M., Pral, E., Alfieri, S., & Teixeira, M. (2009). Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. *Acta tropica*, 112(3), 249–259. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.036

Pereira, A., Vilela, R., Titto, C., Leme-dos-Santos, T., Geraldo, A., Balieiro, J., Calviello, R., Birgel Junior, E., & Titto, E. (2020). Thermoregulatory Responses of Heat Acclimatized

Buffaloes to Simulated Heat Waves. *Animals*, 10(5), 756. https://doi.org/10.3390/ani10050756

Rodrigues, C., Olinda, R., Silva, T., Vale, R., da Silva, A., Lima, G., Garcia, H., Teixeira, M., & Batista, J. (2013). Follicular degeneration in the ovaries of goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax* from the Brazilian semi-arid region. *Veterinary parasitology*, 191(1-2), 146–153. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.08.001

Rodrigues, J., Alencar, A., Lourenço, J., Viana, R., Alves, N. & García, A. (2011). Perfil hematológico de búfalas da raça Murrah, criadas ao sol e à sombra, em clima tropical da Amazônia Oriental. *Acta Amaz.* Vol. 41(3):425-429. https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300014

Sánchez, D. (2022). *Epidemiologia de la tripanosomosis en bovidos del departamento del Caquetá*. [Trabajo de Maestría, Universidad de La Salle]. Repositorio Institucional - Universidad de La Salle. https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_agrociencias/24

Silveira, O., Taveira, R., Amaral, A., Martins, T., Carvalho, F., Oliveira, B., & Peixoto, C. (2016). Avaliação de parâmetros fisiológicos em búfalas da raça Murrah. *Pubvet*, 10(06). https://doi.org/10.22256/pubvet.v10n6.500-502

Tamay, D., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad.* 2(2):70-78.

Ventura, R., Paiva, F., Silva, R., Takeda, G., Buck, G., & Teixeira, M. (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(1), 37–48. https://doi.org/10.1006/expr.2001.4641

Virviescas, F. (1934). Tripanosoma theileria y babesiella en la sangre de un bovino del valle del cauca. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia,* 6(50–52), 898–901.

Zapata, R., Cardona, E., Reyes, J., Triana, O., Peña, V., Ríos, L. y Barahona, R. (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

Zapata, R., Mesa, J., Mejía, J., Reyes, J. y Ríos, L. (2009). Frecuencia de infección por *Trypanosoma sp*. en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en cuatro hatos bufaleros de Barrancabermeja, Colombia. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*, 22(1), 8. https://doi.org/10.17533/udea.rccp.324347

Anexos

Anexo 1

Resultados Extendidos de Sangre

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM
Instituto de Ciências Agrárias (ICA)
Avenida Universitária, 1000 – Bairro Universitário, Unaí - MG

Paciente: Amostragem animais da fazenda **Espécie:** Bubalinos **Sexo:** fêmeas

Proprietário: Granja Experimental Villa Marina (Universidade de Pamplona) - Colômbia

Resultado Citologia

- **Material Examinado:** Esfregaço sanguíneo de ponta de orelha.
  Animais: 3944-0; 3895-4; 3899-6 e 3885-5.
- **Método:** Exame microscópico direto, coloração Panótico/Diff-Quik.
- **Resultados: NEGATIVO**
  - Ausência de formas tripomastigotas de *Trypanosoma* sp. observadas nos esfregaços examinados.
  - **Sensibilidade:** o exame parasitológico direto pode ter baixa sensibilidade, especialmente em fases crônicas da doença ou quando a parasitemia é baixa. Nesses casos, outros métodos diagnósticos como sorologia e PCR são frequentemente recomendados para um diagnóstico definitivo ou diferencial.

Me coloco à disposição para eventuais esclarecimentos.

Celular/Whats app: 55 + (14) 98132 – 2008
E-mail: vivian.zadra@ufvjm.edu.br

Unaí, 22 de Novembro de 2025.

gov.br Documento assinado digitalmente
VIVIAN FERREIRA ZADRA
Data: 22/11/2025 15:15:37-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura

Profa. Dra. Vívian Ferreira Zadra
CRMV – MG 19.980
CRMV – PR 19.752
CRMV – SP 29.260

Anexo 2

BLAST Cebador TviSL15

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trypanosoma vivax spliced-leader SL intergenic region genomic sequence	Trypanosoma …	40.1	40.1	100%	1.6	100.00%	208	GQ913311.1
Theileria parva strain Muguga C2 domain protein (TpMuguga_04g00140), partial mRNA	Theileria parva…	38.2	38.2	95%	6.2	100.00%	6590	XM_758682.2
PREDICTED: Anomalospiza imberbis RNA binding motif protein 47 (RBM47), transcript variant X2, …	Anomalospiza i…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	4566	XM_068188930.1
Mus musculus BAC clone RP23-392H4 from chromosome 7, complete sequence	Mus musculus	36.2	36.2	90%	24	100.00%	187878	AC238840.3
PREDICTED: Anomalospiza imberbis RNA binding motif protein 47 (RBM47), transcript variant X1, …	Anomalospiza i…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	4570	XM_068188929.1
Flavobacteriaceae bacterium M23B6Z8 chromosome, complete genome	Flavobacteriac…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	4461159	CP176050.1
Zea mays CID11 (LOC100274095), mRNA	Zea mays	36.2	36.2	90%	24	100.00%	1530	NM_001148474.1
Alces alces genome assembly, chromosome: 10	Alces alces	36.2	36.2	90%	24	100.00%	79284297	OZ290766.1
Alces alces genome assembly, chromosome: 10	Alces alces	36.2	36.2	90%	24	100.00%	78916819	OZ291525.1
Tissierella carlieri strain WGS1355 chromosome, complete genome	Tissierella carlieri	34.2	34.2	85%	97	100.00%	4263189	CP172320.1
Urochloa humidicola genome assembly, chromosome: 5A_hap2	Urochloa humi…	34.2	68.4	85%	97	100.00%	95289242	OZ277612.1
Steromphala pennanti genome assembly, chromosome: 16	Steromphala p…	34.2	34.2	85%	97	100.00%	54164926	OZ311879.1
PREDICTED: Gossypium arboreum RNA-binding protein 1 (LOC108484141), transcript variant X6, …	Gossypium arb…	34.2	34.2	85%	97	100.00%	1761	XM_053029694.1
PREDICTED: Pongo abelii golgi associated kinase 1B (GASK1B), transcript variant X3, mRNA	Pongo abelii	34.2	34.2	85%	97	100.00%	4894	XM_009240405.4
PREDICTED: Hylobates moloch Golgi-associated kinase 1B-like (LOC116463456), transcript varian…	Hylobates mol…	34.2	34.2	85%	97	100.00%	3138	XM_032146566.2
PREDICTED: Gossypium hirsutum RNA-binding protein 1 (LOC121218187), transcript variant X6, …	Gossypium hir…	34.2	34.2	85%	97	100.00%	1648	XM_041094984.1

Anexo 3

BLAST Cebador TviSL25

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trypanosome vivax mini-exon repeat	Trypanosoma …	40.1	40.1	100%	1.6	100.00%	723	X00631.1
Desulfovibrio desulfuricans strain IC1 chromosome, complete genome	Desulfovibrio d…	38.2	38.2	95%	6.2	100.00%	3251440	CP036295.1
PREDICTED: Manihot esculenta DDT domain-containing protein PTM (LOC110626301), transcript …	Manihot escule…	38.2	38.2	95%	6.2	100.00%	5875	XM_043961524.1
PREDICTED: Canis lupus familiaris uncharacterized LOC111097140 (LOC111097140), transcript v…	Canis lupus fa…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	3682	XR_005363682.1
PREDICTED: Canis lupus familiaris uncharacterized LOC111097140 (LOC111097140), transcript v…	Canis lupus fa…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	3464	XR_005363681.1
PREDICTED: Canis lupus baileyi uncharacterized lncRNA (LOC140640373), transcript variant X1, …	Canis lupus ba…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	3460	XR_012037084.1
Mycolicibacterium crocinum JCM 16369 DNA, complete genome	Mycolicibacteri…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	5965874	AP043817.1
Trypanosoma vivax Y486 annotated genomic contig, chromosome 8	Trypanosoma …	36.2	72.4	90%	24	100.00%	2344661	HE573024.1
Halomonas sp. I5-271120 chromosome, complete genome	Halomonas sp.…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	3812367	CP130701.1
Trypanosoma vivax mini-exon and 5S rRNA gene,strain Desowitz	Trypanosoma …	36.2	36.2	90%	24	100.00%	523	AJ250749.1
PREDICTED: Nasonia vitripennis PR domain zinc finger protein 10 (LOC100678344), transcript var…	Nasonia vitripe…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	4556	XM_031924455.1
Mycolicibacterium crocinum strain JCM 16369 chromosome, complete genome	Mycolicibacteri…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	5965857	CP092362.2
Sitta europaea genome assembly, chromosome: 31	Sitta europaea	36.2	36.2	90%	24	100.00%	4695860	OZ228685.1
PREDICTED: Canis lupus dingo uncharacterized LOC112657040 (LOC112657040), transcript varia…	Canis lupus di…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	3466	XR_003134829.3
Trypanosoma vivax isolate TviMi trans-spliced leader SL sequence	Trypanosoma …	36.2	36.2	90%	24	100.00%	689	AF335565.1
PREDICTED: Canis lupus familiaris uncharacterized LOC111097140 (LOC111097140), transcript v…	Canis lupus fa…	36.2	36.2	90%	24	100.00%	3465	XR_005431378.1

Anexo 4

BLAST Cebador ILO1264

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trypanosoma vivax (ILDat 1.2) species-specific antigen mRNA, complete cds	Trypanosoma …	54.0	54.0	100%	3e-04	100.00%	822	L25129.1
Trypanosoma vivax diagnostic antigen gene, partial cds	Trypanosoma …	54.0	108	100%	3e-04	100.00%	1869	U43183.1
Trypanosoma vivax Y486 annotated genomic contig, chromosome 11	Trypanosoma …	54.0	216	100%	3e-04	100.00%	4838739	HE573027.1
Synechocystis sp. PCC 6714, complete genome	Synechocystis …	42.1	42.1	78%	0.99	100.00%	3485441	CP007542.1
Pseudomonas sp. AA-38 chromosome, complete genome	Pseudomonas …	40.1	201	96%	3.9	100.00%	5548222	CP120359.1
Pseudomonas sp. GOM7 chromosome, complete genome	Pseudomonas …	40.1	201	96%	3.9	100.00%	5424934	CP113519.1
Pseudomonas sp. phDV1 chromosome, complete genome	Pseudomonas …	40.1	72.4	89%	3.9	100.00%	4727682	CP031606.1
Ferrimonas sp. YFM DNA, complete genome	Ferrimonas sp…	40.1	40.1	74%	3.9	100.00%	4662746	AP027368.1
Pseudomonas sp. THAF42 chromosome, complete genome	Pseudomonas …	40.1	104	89%	3.9	100.00%	5298227	CP045359.1
Pseudomonas sp. THAF187a chromosome, complete genome	Pseudomonas …	40.1	104	89%	3.9	100.00%	5298761	CP045349.1
Pseudomonas wenzhouensis strain A20 chromosome, complete genome	Pseudomonas …	40.1	72.4	89%	3.9	100.00%	4452100	CP072610.1
Ectopseudomonas khazarica strain ODT-83 chromosome, complete genome	Ectopseudomo…	40.1	104	89%	3.9	100.00%	5384159	CP068551.1
Pseudomonas sp. REST10 chromosome	Pseudomonas …	40.1	104	89%	3.9	100.00%	5073673	CP035677.1
PREDICTED: Hippoglossus hippoglossus uncharacterized si:dkey-250l23.4 (si:dkey-250l23.4), mR…	Hippoglossus …	38.2	38.2	85%	15	95.65%	3123	XM_034596150.1
Pseudomonas gorinensis strain NT2 chromosome, complete genome	Pseudomonas …	38.2	70.4	70%	15	100.00%	7080597	CP167125.1
Pseudomonas sp. FP833 chromosome, complete genome	Pseudomonas …	38.2	70.4	70%	15	100.00%	7251230	CP117424.1

Anexo 5

BLAST Cebador ILO1265

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trypanosoma vivax Y486 annotated genomic contig, chromosome 11	Trypanosoma vivax Y486	60.2	301	100%	6e-06	100.00%	4838739	HE573027.1
Trypanosoma vivax diagnostic antigen gene, partial cds	Trypanosoma vivax	60.2	60.2	100%	6e-06	100.00%	1869	U43183.1
Trypanosoma vivax (ILDat 1.2) species-specific antigen mRNA, complete cds	Trypanosoma vivax	60.2	60.2	100%	6e-06	100.00%	822	L25129.1

Anexo 6

BLAST Cebador TviCatL

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trypanosoma vivax isolate TviPTa009 cathepsin L-like protein gene, partial…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	192	OR854246.1
Trypanosoma vivax isolate MAT6-9 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	194	PQ317129.1
Trypanosoma vivax isolate ELI7-5 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene,…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	196	PQ317126.1
Trypanosoma vivax isolate AN3-3 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene,…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	196	PQ317125.1
Trypanosoma vivax isolate AN2-2 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene,…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	195	PQ317124.1
Trypanosoma vivax isolate AN1-1 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene,…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	187	PQ317123.1
Trypanosoma vivax isolate M06-13 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	195	PQ317122.1
Trypanosoma vivax isolate L12-12 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene,…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	195	PQ317121.1
Trypanosoma vivax isolate L04-10 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene,…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	195	PQ317119.1
Trypanosoma vivax isolate 851.1 clone 2 cathepsin L-like protein (CATL) ge…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	354	MF142350.1
Trypanosoma vivax isolate 851.1 cathepsin L-like protein (CATL) gene, parti…	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	354	MF142349.1
Trypanosoma vivax isolate tv146 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	449	PP261311.1
Trypanosoma vivax isolate tv171 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	449	PP261310.1
Trypanosoma vivax isolate tv165 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	449	PP261309.1
Trypanosoma vivax isolate tv147 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	449	PP261308.1
Trypanosoma vivax isolate tv119 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	449	PP261307.1
Trypanosoma vivax isolate tv117 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	449	PP261306.1
Trypanosoma vivax isolate tv342 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	449	PP261305.1
Trypanosoma vivax isolate tv170 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	450	PP278991.1
Trypanosoma vivax isolate TviBrRp.cl2 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	177	KR822729.1
Trypanosoma vivax isolate TviBrRp.cl1 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	177	KR822728.1
Trypanosoma vivax isolate TviBrMo.cl8 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	Trypanoso…	46.1	46.1	100%	0.070	100.00%	177	KR822727.1

Anexo 7

BLAST Cebador DTO155

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Trypanosoma vivax gene for cathepsin L-like protein, partial cds, clone: z_42b	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	450	AB781073.1
Trypanosoma vivax isolate IL3905 clone 8 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	477	EU753803.1
Trypanosoma vivax isolate SaMz07ca cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	178	EU753816.1
Trypanosoma vivax isolate MAT6-9 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene, partial sequence	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	194	PQ317129.1
Trypanosoma vivax isolate Y486 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	477	EU753794.1
Trypanosoma vivax isolate IL3905 clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	477	EU753802.1
Trypanosoma vivax gene for cathepsin L-like protein, partial cds, clone: z_49a	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	450	AB781076.1
Trypanosoma vivax isolate L12-12 cathepsin L-like protein-like (CatL) gene, partial sequence	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	195	PQ317121.1
Trypanosoma vivax isolate CBbo12 clone 3 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	477	EU753809.1
Trypanosoma vivax isolate TviBrRp.cl2 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	177	KR822729.1
Trypanosoma vivax isolate TviMzNy clone 39 cathepsin L-like protein-like gene, partial sequence	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	477	EU753815.1
Trypanosoma vivax isolate TviVeMe clone 2 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	477	EU753791.1
Trypanosoma vivax isolate TviBrDo.cl2 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	177	KR822715.1
Trypanosoma vivax isolate TviBrDo.cl4 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	177	KR822717.1
Trypanosoma vivax isolate TviBrDo.cl8 cathepsin L (CatL) gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	177	KR822721.1
Trypanosoma vivax isolate IL3905 clone 14 cathepsin L-like protein gene, partial cds	Trypanosoma…	46.1	46.1	100%	0.025	100.00%	477	EU753805.1