



UNIVERSITÉ DE LIÈGE  
FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE  
DÉPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES  
SERVICE D'ÉPIDÉMIOLOGIE ET ANALYSE DE RISQUES  
APPLIQUÉES AUX SCIENCES VÉTÉRINAIRES

**ÉTUDE ÉPIDÉMIOLOGIQUE DE *Trypanosoma* spp. ET  
D'AUTRES AGENTS HÉMOTROPES (*Anaplasma marginale*,  
*Babesia* spp.) CHEZ LES BOVINS EN ÉQUATEUR**

**EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF *Trypanosoma* spp. AND OTHER  
HEMOTROPIC AGENTS (*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp.) IN  
CATTLE IN ECUADOR**

**María Augusta Chávez Larrea**

**THESE PRESENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2023-2024**

## REMERCIEMENTS

A mon promoteur de thèse, le Professeur Dr Claude Saegerman, mes remerciements pour m'avoir permis de faire partie de son équipe pendant l'exécution du projet Brutryp et pour ses conseils avisés dans la conception de nouvelles idées et de solutions durant l'exécution de la recherche et son orientation.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon co-promoteur de thèse, le Professeur Armando Reyna, pour sa sincère amitié tout au long de ces années, qui m'a permis d'entrer dans le monde des agents hématropes, ainsi que pour ses conseils et son orientation lors des travaux de terrain, de laboratoire et pour la rédaction des articles scientifiques et du document de thèse.

Je voudrais remercier Cristina Cholota pour toute l'aide qu'elle a apportée dans l'exécution et l'interprétation des résultats de la PCR, du séquençage et de la phylogénie, à Michelle Yugcha pour toute sa collaboration dans l'organisation des données et des analyses de laboratoire.

À mes collègues et amis de l'unité de recherche en épidémiologie et analyse des risques appliquées aux sciences vétérinaires de la Faculté Vétérinaire de l'Université de Liège, Marie-France Humblet, Véronique Renault, Noémie El Agrebi, Gianni Parisi, Constance Wielick, Gabriel Carrillo, Valeria Paucar, Anita Garrido, Sofia Ocaña et Felipe Rivas pour leur agréable compagnie et leurs conseils opportuns qui ont rendu mon séjour à l'Université plus agréable.

Je suis reconnaissant à l'Académie belge pour la Recherche et l'Enseignement Supérieur, ARES, en particulier à Mme Maryvonne Aubry et à Clara Frognet de l'Université de Liège-PACODEL pour toutes les dispositions administratives prises pour la réalisation du doctorat en Belgique.

Je tiens également à remercier le personnel de la *Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonitario del Ecuador*, *AGROCALIDAD*, ainsi que la *Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos ABG*, qui ont apporté un soutien logistique pour le travail de terrain dans les exploitations.

Je tiens également à remercier tous les éleveurs et organisations d'éleveurs des provinces de Manabí, Santo Domingo, Pichincha, Napo, Sucumbios et Galápagos qui nous ont permis d'accéder à leurs exploitations pour collecter des informations et des échantillons de leurs animaux. Nous

remercions les responsables des fermes d'élevage de Quito et de Santo Domingo de nous avoir permis d'accéder à leurs fermes pour collecter des échantillons.

Mes remerciements vont aux autorités de la *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*, qui ont accordé les permissions respectives pour réaliser mes études doctorales. Au groupe d'étudiants et de thésards des carrières de Biotechnologie et IASA du Département des Sciences de la Vie et de l'Agriculture de l'ESPE, qui ont aidé à la collecte d'échantillons lors des interventions dans les fermes et les abattoirs thésards des carrières de Biotechnologie et IASA du Département des Sciences de la Vie et de l'Agriculture de l'ESPE qui ont aidé à la collecte d'échantillons lors des interventions dans les fermes et les abattoirs.

Je remercie sincèrement ma famille et mes amis qui m'ont apporté un soutien émotionnel et m'ont encouragé tout au long de mes études.

À Jorge, pour avoir fait partie de ma vie et avoir été mon meilleur compagnon dans le monde gratifiant de la science et de l'académie.



## *Abréviations*

<b>ABG</b>	<i>Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad para Galápagos</i>
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>kAND</b>	Acide désoxyribonucléique du kinétoplaste
<b>AGROCALIDAD</b>	<i>Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario de Ecuador</i>
<b>ARES</b>	Académie de Recherche et d'Enseignement Supérieur
<b>ARNr</b>	Acide ribonucléique ribosomal
<b>CatL</b>	Cystéine protéase cathepsine
<b>CATT</b>	Test d'Agglutination sur Carte pour la Trypanosomose
<b>COI</b>	Sous-unité I du cytochrome c oxydase
<b>ESPE</b>	<i>Universidad de las Fuerzas Armadas</i>
<b>ELISAc</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay compétitif</i>
<b>ELISAI</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay indirect</i>
<b>HCT</b>	Hématocrite
<b>IFAT</b>	<i>Immunofluorescence antibody test</i>
<b>INEC</b>	<i>Instituto Nacional de Estadísticas y Censos del Ecuador</i>
<b>ITS</b>	Espaceur transcrit
<b>L</b>	Litre
<b>mL</b>	Millilitre
<b>m.s.n.m</b>	Mètres au-dessus du niveau de la mer
<b>MSP</b>	Protéines de surface membranaires
<b>OMSA</b>	<i>Organización Mundial de Sanidad Animal</i>
<b>PIB</b>	Produit intérieur brut
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PCV</b>	<i>Packed cells volume</i>
<b>RFLP</b>	Polymorphisme de longueur des fragments de restriction
<b>RAP-1</b>	Protéine associée à la rhoptrie 1
<b>IFAT</b>	Technique d'immunofluorescence indirecte
<b>UPA</b>	Unité productive d'agro-élevage
<b>µL</b>	Microlitre
<b>µ</b>	Microns
<b>WOAH/OIE</b>	<i>World Organisation for Animal Health</i>

## Table des matières

<b>RESUME</b> .....	2
<b>PREAMBULO GENERALE</b> .....	12
<b>INTRODUCTION</b> .....	16
1. SITUATION GEOGRAPHIQUE DE L'ÉQUATEUR.....	17
2. SYSTEMES D'ELEVAGE BOVIN EN ÉQUATEUR .....	18
3. SITUATION DES PRINCIPALES MALADIES HEMOTROPES CHEZ LES BOVINS EN ÉQUATEUR .....	19
4. RACES BOVINES EN ÉQUATEUR .....	22
5. IMPACT ECONOMIQUE DES MALADIES HEMOTROPES SUR LA PRODUCTION BOVINE .....	23
6. DESCRIPTION DES PRINCIPALES MALADIES HEMOTROPES DES BOVINS PRESENTES EN AMERIQUE DU SUD.....	24
6.1 <i>Anaplasmose</i> .....	24
6.1.1 Agent causal et taxonomie .....	24
6.1.2 Taxonomie et principales espèces d' <i>Anaplasma</i> spp. qui affectent le bétail .....	24
6.1.3 Transmission.....	25
6.1.4 Cycle biologique .....	26
6.1.5 Signes cliniques.....	27
6.2 <i>Babésiose</i> .....	27
6.2.1 Agent causal et taxonomie .....	27
6.2.2 Taxonomie et principales espèces de <i>Babesia</i> affectant le bétail en Amérique du Sud .....	28
6.2.3 Transmission.....	28
6.2.4 Cycle biologique .....	29
6.2.5 Signes cliniques.....	30
6.3 <i>Trypanosomose</i> .....	31
6.3.1 Agent causal et taxonomie .....	31
6.3.2 Taxonomie et principales espèces de <i>Trypanosoma</i> chez les bovins en Amérique du Sud.....	32

---

6.3.3	Transmission.....	32
6.3.4	Cycle biologique : <i>Trypanosoma vivax</i> , <i>T. evansi</i> et <i>T. theileri</i> .....	36
6.3.5	Signes cliniques.....	37
6.4	<i>Diagnostic</i> .....	41
6.4.1	Techniques parasitologiques .....	41
6.4.2	Techniques moléculaires.....	44
6.4.3	Diagnostic sérologique .....	48
6.4.4	Traitement.....	49
	<b>SECTION EXPERIMENTALE</b> .....	53
	SECTION EXPERIMENTALE : ÉTUDE 1 .....	54
	SECTION EXPERIMENTALE : ÉTUDE 2 .....	63
	SECTION EXPERIMENTALE : ÉTUDE 3 .....	72
	SECTION EXPERIMENTALE : ÉTUDE 4 .....	88
	SECTION EXPERIMENTALE : ÉTUDE 5 .....	101
	SECTION EXPERIMENTALE : ÉTUDE 6 .....	130
	<b>PERSPECTIVES, DISCUSSION GENERALE, RECOMMANDATIONS, CONCLUSIONS,</b> <b>LIMITES ET PERSPECTIVES</b> .....	157

## Liste des tableaux et figures

### Liste de tableaux

Tableau 1 : Concordance entre les activites et les etudes realisees dans le cadre de la these ...	14
Tableau 2. Voies de transmission d' <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Babesia</i> spp. et <i>Trypanosoma</i> spp. chez les bovins en Amerique du Sud.....	35
Tableau 3. Agents hemotropes et signes cliniques chez les bovins affectes par <i>A. marginale</i> , <i>Babesia</i> spp et <i>T. vivax</i> en amerique du sud.....	39
Tableau 4. Liste des primers utilisees pour l'analyse moleculaire par PCR pour la detection des agents hemoparasites chez les bovins .....	47

### Liste de figures

Figure 1. Regions geographiques de l'Equateur.....	18
Figure 2. Taxonomie des principales especes d' <i>Anaplasma</i> spp. qui affectent le betail .....	25
Figure 3. Taxonomie des principales especes de <i>Babesia</i> spp. qui affectent le betail .....	28
Figure 4. Taxonomie des principales especes de <i>Trypanosoma</i> spp. qui affectent le betail .....	32
Figure 5. <i>Anaplasma marginale</i> .....	42
Figure 6. <i>Babesia bigemina</i> (A) et <i>Babesia bovis</i> (B) .....	42
Figure 7. <i>Trypanosoma vivax</i> (A), <i>Trypanosoma evansi</i> (B) et <i>Trypanosoma theileri</i> (C).....	43

---

**Résumé – Resumen -  
Abstract**

---

## Résumé

À ce jour, en Équateur, il y a très peu d'études sur l'anaplasmosse et la babésiose chez les bovins et aucune information n'est disponible sur les agents responsables, la distribution, la prévalence, la transmission et le traitement sur la trypanosomose bovine. Cette thèse a été réalisée dans le cadre des activités d'un projet de recherche et développement sur la brucellose et la trypanosomose bovine en Équateur (BruTryp) grâce à un financement de l'ARES Belgique et le support de l'Université de Liège et de l'*Universidad de las Fuerzas Armadas* (ESPE) d'Équateur. Bien que les travaux se soient concentrés sur l'étude de la trypanosomose bovine, la collaboration avec les organismes officiels de contrôle et la standardisation des techniques de diagnostic ont permis d'élargir le sujet d'étude.

Ce travail a été réalisé dans une zone du territoire équatorien qui couvre les quatre régions naturelles (Côte, Sierra, Amazonie et Galápagos). Plusieurs stratégies ont été proposées pour la collecte et l'analyse d'échantillons dans le but de contribuer à la lutte contre les agents hémotropes chez les bovins en Équateur, pour l'identification et l'isolement des agents responsables (*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp et *Trypanosoma* spp) et le développement de protocoles de gestion de foyers.

Dans la première étude, grâce à la biologie moléculaire, *Anaplasma marginale* a été identifiée pour la première fois par standardisation d'une PCR msp5. Pour cela, 15 fermes laitières a été visitées et 151 échantillons de sang bovin ont été collectés dans la province de Santo Domingo de los Tsachilas. Sur les 151 échantillons de sang, le gène spécifique msp5 d'*A. marginale* a été identifié dans 86,1 % des échantillons (130/151). L'analyse de la séquence 16 S de ADNr de deux échantillons positifs a révélé une identité à 100 % avec *A. marginale*.

La deuxième étude visait à identifier et caractériser *Trypanosoma vivax* par une PCR CatL dans le contexte d'un foyer dans la province de Manabí (région côtière). Trois fermes bovines ont été visitées et un total de 20 échantillons de sang ont été collectés. Trois animaux se sont révélés positifs et l'analyse phylogénétique a démontré une relation étroite avec les isolats identifiés en Amérique du Sud et en Afrique de l'Ouest. Il s'agissait du premier signalement moléculaire de *T. vivax* chez des bovins en Équateur. Avant ce premier signalement de *T. vivax* dans le pays, une étude menée en 1977 avait trouvé 22.5 % d'échantillons séro-positifs chez des bovins en utilisant la technique d'immunofluorescence indirecte selon Wells (1977).

Une autre étude a porté sur la détection de *Babesia* spp. chez des bovins dans une zone de haute altitude en Équateur (province de Pichincha de la région Sierra) où un foyer avait été détecté. Une étude transversale a également été réalisée au cours de laquelle 264 bovins a été échantillonné dans 20 élevages de la province de Manabí (région côtière). Pour le diagnostic des *Babesia* spp, une RFLP-PCR a été

utilisée pour la détection du fragment 18S, les amplicons ont ensuite été coupés avec des enzymes de restriction pour l'identification de *B. bovis* et *B. bigemina*. Dans le foyer (province de Pichincha), 20,3 % (29/143) des bovins étaient positifs et dans la province de Manabi, 18,9 % (50/264) des bovins étaient positifs. Dans cette étude, *B. bigemina* et de *B. bovis* ont été identifiés chez des bovins en Equateur. Il s'agit également de la première preuve de présence de *Babesia* spp. chez des bovins à 2 469 m d'altitude.

Une quatrième étude a été réalisée dans deux abattoirs d'Équateur pour l'identification de *T. theileri* et d'autres agents hémotropes. Dans l'abattoir de Quito (région de la Sierra) et Santo Domingo (région de la Côte), un total de 83 et 135 échantillons de sang a été collecté, respectivement. Pour cette étude, des techniques moléculaires telles qu'une PCR CatL ont été utilisées pour la détection de *T. theileri* et *T. vivax*, ainsi que la PCR msp5, PCR RAP-1 et la PCR HYP pour, respectivement, le diagnostic d'*A. marginale*, de *B. bovis* et de *B. bigemina*. Au total, 34 des 218 échantillons (15,6 %) étaient positifs pour *T. theileri* par PCR CatL. A l'abattoir de Quito, 20/83 (24,1%) des échantillons étaient positifs et à l'abattoir de Santo Domingo, 14/135 (10,4%) d'entre eux étaient positifs. Dans le cas de *T. vivax*, 16/218 (7,3 %) animaux positifs ont été trouvés dans les deux abattoirs. Treize échantillons équatoriens de *T. theileri* ont été identifiés dans deux lignages : ThI (n = 7/13) et ThII (n = 6/13) et un arbre phylogénétique a été élaboré. Dans cette étude, une co-infection avec d'autres agents hémotropes tels qu'*A. marginale*, *Babesia* spp. et *T. vivax* a été mise en évidence dans 31 des 34 échantillons.

La cinquième étude a été réalisée dans les îles Galápagos de la région insulaire dans le but de déterminer la présence d'agents hémotropes chez les bovins. Au total, 170 échantillons de sang provenant de 19 fermes ont été collectés. Les échantillons ont été analysés à l'aide de la technique PCR. La prévalence chez les bovins de *T. vivax*, *Babesia* spp., *B. bovis*, *B. bigemina* et *A. marginale* était respectivement de 14,7 %, 20 %, 11,2 %, 14,7 % et 67,1 %. Dans cette étude, la présence de quatre agents hémotropes a été mise en évidence dans 26,3% (5/19) des élevages. Les bovins co-infectés (*A. marginale*, *Babesia* spp. et *T. vivax*) avaient une température corporelle significativement plus élevée que les autres (p = 0,047).

La sixième étude a été menée dans trois contextes épidémiologiques différents, à savoir : Chone, province de Manabi (région de la Côte), une zone où la présence de *T. vivax* a été signalée ; Guayllabamba, province de Pichincha (région Sierra), une zone où sa présence n'est pas connue, et Tena, province de Napo (région de l'Amazonie) une zone dans le contexte d'un foyer de *T. vivax*, avec l'objectif de détecter et caractériser *T. vivax* chez les mouches hématophages et chez le bétail. Au total, 11 mouches hématophages et 301 échantillons de sang bovin ont été analysés par PCR CatL pour l'identification de *T. vivax*. Parmi les mouches collectées, elles ont d'abord été identifiées moléculairement par PCR 16S et COI, l'analyse a montré que 9 étaient de la famille des Tabanidae et 2 étaient des *Stomoxys calcitrans*. Parmi les Tabanidae testées, 3 étaient positifs pour *T. vivax*. Chez les bovins, 14,4 % étaient positifs pour *T. vivax* dans la région de Chone-Manabi, 25,3 % dans celle de

Guayllabamba-Pichincha et 43,5 % dans celle de Tena-Napo. Les mouches de la famille des Tabanidae pourraient constituer des vecteurs importants de transmission mécanique de *T. vivax* au bétail, dans les trois régions d'Équateur.

La mise en évidence des principaux agents responsables de l'anaplasmose, de la babésiose et de la trypanosomose, ainsi que leur répartition géographique, leur prévalence et la présence de vecteurs potentiels, constituent un point de départ qui nous permettra de comprendre ces maladies chez les bovins et d'établir des mesures de prévention et de traitement adaptées.

## RESUMEN

Hasta la fecha, en Ecuador se han realizado muy pocos estudios sobre la anaplasmosis y la babesiosis en el ganado bovino, y sobre la trypanosomosis no se dispone de información sobre los agentes causales, la distribución, la prevalencia, la transmisión y el tratamiento. Esta tesis se realizó dentro del marco de actividades de un proyecto de investigación sobre brucelosis y trypanosomosis bovina en Ecuador (BruTryp) con financiamiento de ARES Bélgica - Université de Liège - Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE Ecuador. Aunque el trabajo se centró en el estudio de la trypanosomosis bovina, la colaboración con organismos oficiales de control y la estandarización de técnicas de diagnóstico permitieron ampliar el objeto de estudio.

Para el presente estudio se identificó una franja del territorio ecuatoriano que abarca las cuatro regiones naturales (Costa, Sierra, Amazonía y Galápagos). Se propusieron varias estrategias para la recolección y análisis de muestras con el objetivo de contribuir al control de los agentes hemotrópicos en bovinos en Ecuador, para la identificación y aislamiento de los agentes causales (*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp y *Trypanosoma* spp) y el desarrollo de protocolos de manejo de brotes.

Un primer estudio previsto en el presente trabajo fue la primera identificación molecular de *Anaplasma marginale* mediante la normalización de una PCR msp5. Se visitaron 15 explotaciones lecheras y se recogieron 151 muestras de sangre bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsachilas. De las 151 muestras de sangre, se identificó el gen específico msp5 de *A. marginale* en el 86,1% (130/151). El análisis de la secuencia de ADNr 16S de dos muestras positivas reveló una identidad del 100% con *A. marginale*.

El segundo estudio tenía por objeto identificar y caracterizar *Trypanosoma vivax* mediante PCR CatL en el contexto de un brote en la provincia de Manabí (Región Litoral). Se muestrearon tres explotaciones ganaderas en las que se recogieron un total de 20 muestras de sangre bovina. Tres animales resultaron positivos y el análisis filogenético demostró una estrecha relación con aislados notificados en Sudamérica y África Occidental. Este fue el primer reporte molecular de *T. vivax* en bovinos en Ecuador, tras un primer reporte de *T. vivax* en el ganado bovino, donde se encontró 22% de animales positivos a la técnica de inmunofluorescencia indirecta, según Wells 1977. En otro estudio se examinó la detección de *Babesia* spp. en bovinos de una zona de gran altitud de Ecuador (provincia de Pichincha, en la región de la Sierra) donde se detectó un brote, y también se llevó a cabo un estudio transversal en el que se tomaron muestras de un total de 264 bovinos de 20 explotaciones de la provincia de Manabí (región costera). Para diagnosticar *Babesia* spp se utilizó RFLP-PCR para detectar el fragmento 18S, y a continuación se cortaron los amplicones con enzimas de restricción para identificar *B. bovis* y *B. bigemina*. Durante el brote, se observó que el 20,3% (29/143) de los bovinos eran positivos y el 18,9%

(50/264) de los bovinos de El Carmen eran positivos. En este estudio se identificaron por primera vez *B. bigemina* y *B. bovis* en bovinos de Ecuador, así como la primera prueba de la presencia de *Babesia* spp. en bovinos a una altitud de 2.469 m.

Se realizó un cuarto estudio en dos mataderos de Ecuador para identificar *T. theileri* y otros agentes hemotrópicos. En los mataderos de Quito (región Sierra) y Santo Domingo (región Costa) se recogieron un total de 83 y 135 muestras de sangre. Para este estudio se utilizaron técnicas moleculares como la PCR CatL para la detección de *T. theileri* y *T. vivax*, así como la PCR msp5, la PCR RAP-1 y la PCR HYP para el diagnóstico de *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina*, respectivamente. En total, 34 de las 218 muestras (15,6%) resultaron positivas para *T. theileri* por PCR CatL. En el matadero de Quito, 20/83 (24,1%) fueron positivas y en el de Santo Domingo, 14/135 (10,4%). En el caso de *T. vivax* se encontró 16/218 (7,3%) de animales positivos en los dos mataderos. Se identificaron trece muestras de *T. theileri*, distribuidas en dos linajes: ThI (n = 7/13) y ThII (n = 6/13) según el análisis filogenético. En este estudio, la coinfección también fue evidente en 31 de las 34 muestras con otros agentes hemotrópicos: *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp y *T. vivax*.

El quinto estudio se llevó a cabo en las islas Galápagos para determinar la presencia de agentes hemotrópicos en el ganado vacuno. Se recogieron 170 muestras de sangre procedentes de 19 explotaciones. La prevalencia de *T. vivax*, *Babesia* spp., *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale* en bovinos fue del 14,7%, 20%, 11,2%, 14,7% y 67,1% respectivamente. Los resultados demostraron la presencia de *T. vivax* y *B. bovis* en bovinos de la isla Santa Cruz en las Galápagos y de coinfecciones entre estos agentes hemotrópicos. En este estudio se destacó la presencia de cuatro agentes hemotrópicos en el 26,3% (5/19) de las explotaciones. El ganado coinfectado (*A. marginale*, *Babesia* spp. y *T. vivax*) tuvo una temperatura corporal significativamente más alta que los demás (p = 0,047).

El sexto estudio se realizó en tres contextos epidemiológicos diferentes, a saber: Chone, provincia de Manabí (región Costa), zona donde se ha reportado la presencia de *T. vivax*; Guayllabamba, provincia de Pichincha (región Sierra), zona donde se desconoce su presencia, y Tena, provincia de Napo (región Amazónica), zona en el contexto de un brote de *T. vivax*, con el objetivo de detectar y caracterizar *T. vivax* en moscas y ganado. Se analizaron mediante CatL PCR un total de 11 moscas y 301 muestras de sangre bovina para la identificación de *T. vivax*. Entre las moscas recolectadas, primero fueron identificadas molecularmente mediante 16S PCR y COI, el análisis mostró que 9 eran de la familia Tabanidae y 2 eran *Stomoxys calcitrans*. Entre los Tabanidos analizados, 3 resultaron positivos para *T. vivax*. Entre los bovinos, el 14,4% fueron positivos a *T. vivax* en la región Chone-Manabí, el 25,3% en la región Guayllabamba-Pichincha y el 43,5% en la región Tena-Napo. Las moscas de la familia Tabanidae podrían constituir un importante vector de transmisión mecánica de *T. vivax* al ganado en las tres regiones del Ecuador. La identificación de los principales agentes responsables de la anaplasmosis, la babesiosis y la trypanosomosis, junto con su distribución geográfica, su prevalencia y

la presencia de vectores potenciales, constituye un punto de partida para comprender estas enfermedades en el ganado bovino y establecer medidas de prevención y tratamiento.

La identificación de los principales agentes responsables de la anaplasmosis, la babesiosis y la trypanosomosis, junto con su distribución geográfica, su prevalencia y la presencia de vectores potenciales, constituye un punto de partida para comprender estas enfermedades en el ganado bovino y establecer medidas de prevención y tratamiento.

## SUMMARY

To date, very few studies have been carried out in Ecuador on anaplasmosis and babesiosis in cattle, and on trypanosomoses; there is no information available on the causal agents, distribution, prevalence, transmission and treatment of these infectious diseases. This thesis was carried out within the framework of a research project on bovine brucellosis and trypanosomoses in Ecuador (BruTryp) with funding from ARES Belgium - Université de Liège - *Universidad de las Fuerzas Armadas* (ESPE), Ecuador. Although the work focused on the study of bovine trypanosomoses, collaboration with official control agencies and the standardization of diagnostic techniques made it possible to broaden the object of the study.

This work was carried out in an area of the Ecuadorian territory that covers the four natural regions (Coast, Sierra, Amazon and Galápagos). Several strategies were proposed for the collection and analysis of samples with the objective of contributing to the control of hemotropic agents in Ecuadorian cattle, for the identification and isolation of causal agents (*A. marginale*, *Babesia* spp. and *Trypanosoma* spp.) and the development of protocols to manage an outbreak.

In the first study, thanks to molecular biology, *Anaplasma marginale* was identified for the first time by standardization of an msp5 PCR. Fifteen dairy farms were visited and 151 bovine blood samples were collected in the province of Santo Domingo de los Tsachilas. The *A. marginale* specific msp5 gene was identified in 86.1% (130/151) of the 151 blood samples. The analysis of the 16S rDNA sequence of two positive samples revealed a 100% identity with *A. marginale*.

The second study aimed to identify and characterize *Trypanosoma vivax* by CatL PCR in the context of an outbreak in the province of Manabí (Littoral Region). Three cattle farms were sampled in which a total of 20 bovine blood samples were collected. Three animals tested positive and a phylogenetic analysis showed a close relationship with isolates reported in South America and West Africa. After the first report of *T. vivax* in the country, where 22.5% samples in cattle were positive using indirect immunofluorescence technique according to Wells (1977).

Another study allowed detecting *Babesia* spp. in cattle in a high-altitude area of Ecuador (Pichincha province, in the Sierra region) where an outbreak was detected, and a cross-sectional study was also carried out in which a total of 264 cattle were sampled from 20 farms in Manabí province (coastal region). To diagnose *Babesia* spp, RFLP-PCR was used to detect the 18S fragment, the amplicons were then cut with restriction enzymes to identify *B. bovis* and *B. bigemina*. During the outbreak (Pichincha province), 20,3% (29/143) of cattle were positive and 18,9% (50/264) of cattle were positive. In this study, *B. bigemina* and *B. bovis* were identified for the first time in cattle in Ecuador. It is also the first evidence of the presence of *Babesia* spp. in cattle at 2,469 m altitude.

A fourth study was conducted in two Ecuadorian slaughterhouses to identify *T. theileri* and other hemotropic agents. A total of 83 and 135 blood samples were respectively collected at the slaughterhouses of Quito (Sierra region) and Santo Domingo (Costal region). Molecular techniques such as CatL PCR for the detection of *T. theileri* and *T. vivax*, as well as msp5 PCR, RAP-1 PCR and HYP PCR for the diagnosis of *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina*, respectively, were used. Out of 218 samples, 34 (15.6%) were positive for *T. theileri* by CatL PCR. In the Quito slaughterhouse, 20/83 (24.1%) samples were positive vs. 14/135 (10.4%) in the Santo Domingo slaughterhouse. In the case of *T. vivax*, 16/218 (7.3%) positive animals were found in the two slaughterhouses. Thirteen samples of *T. theileri* were identified, distributed in two lineages: ThI (n = 7/13) and ThII (n = 6/13) according to the phylogenetic analysis. In this study, coinfection with other hemotropic agents such as *A. marginale*, *Babesia* spp. and *T. vivax* was also evidenced in 31 out of the 34 samples.

The fifth study was carried out in the Galapagos Islands to determine the presence of hemotropic agents in cattle. A total of 170 blood samples were collected from 19 farms. The prevalence of *T. vivax*, *Babesia* spp., *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* was 14.7%, 20%, 11.2%, 14.7% and 67.1%, respectively. The results demonstrated for the first time the presence of *T. vivax* and *B. bovis* in cattle on Santa Cruz Island in the Galápagos. In this study the presence of four hemotropic agents was removed in 26.3% (5/19) of the farms. The coinfecting organism (*A. marginale*, *Babesia* spp. and *T. vivax*) has a body temperature significantly higher than the previous ones ( $p = 0.047$ ).

The sixth study was conducted in three different epidemiological contexts, namely: Chone, Manabí province (Coast region), an area where *T. vivax* has been reported; Guayllabamba, Pichincha province (Sierra region), an area where its presence is unknown; and Tena, Napo province (Amazon region), an area in the context of a *T. vivax* outbreak, with the objective of detecting and characterizing *T. vivax* in flies and cattle. A total of 11 flies and 301 bovine blood samples were analyzed by CatL PCR to identify *T. vivax*. Among the flies collected, they were first molecularly identified by 16S PCR and COI, the analysis showed that 9 were of the family Tabanidae and 2 were *Stomoxys calcitrans*. Among the Tabanidae tested, 3 were positive for *T. vivax*. Among cattle, 14.4% were positive for *T. vivax* in the Chone-Manabi region, 25.3% in the Guayllabamba-Pichincha region and 43.5% in the Tena-Napo region. Flies of the family Tabanidae could constitute an important vector of mechanical transmission of *T. vivax* to cattle in the three regions of Ecuador.

The identification of the main agents responsible for anaplasmosis, babesiosis and trypanosomiasis, together with their geographical distribution, prevalence and the presence of potential vectors, is a starting point for understanding these diseases in cattle and establishing prevention and treatment measures.





---

# **Préambule général**

---

Bien que l'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose figurent sur la liste des maladies à déclaration obligatoire pour différentes espèces animales en Équateur (AGROCALIDAD, 2020), très peu d'informations sont disponibles sur leurs prévalences, leurs distributions et les techniques de diagnostic. Bien qu'il existe des techniques de diagnostic parasitologique comme les frottis sanguins avec coloration GIEMSA, leur utilisation est limitée en raison de leur faible sensibilité. En Equateur, les médicaments autorisés pour AGROCALIDAD, pour le traitement des agents hémotropes sont l'oxytétracycline, l'imidocarb et le diminazene aceturate, mais il y a un manque d'informations sur l'efficacité des traitements pour les animaux atteints par ces agents, surtout en cas de trypanosomose. Un diagnostic correct, identifiant l'agent pathogène à l'origine de la maladie, est de la plus haute importance car sa présence peut ainsi être surveillée pour établir des mesures de prévention et de contrôle adéquates.

Une recherche a été développée dans le cadre des activités du projet : « Création d'une plateforme d'appui à la formation et à la sensibilisation, au diagnostic et au développement d'une stratégie de contrôle de la brucellose et de la trypanosomoses en Équateur – BruTryp » avec le financement de l'ARES et le support de l'ULiège et l'ESPE. Les zones d'étude établies dans le cadre du projet étaient situées dans une zone qui couvre les trois régions de l'Équateur et qui inclut les provinces suivantes : Manabí et Santo Domingo de los Tsachilas (région Côtière), Pichincha (région de la Sierra) et Napo et Orellana (région amazonienne). La région des îles Galápagos a également été envisagée (région insulaire) dans ce travail.

En raison de l'ampleur du processus de prélèvements sanguins chez les bovins tout au long de ce travail, de la difficulté de mobilité des équipements de laboratoire et du temps de réaction face aux foyers, certaines stratégies ont été mises en œuvre et adaptées à différentes zones :

- Des études transversales ont été menées dans les zones où des agents hémotropes et des vecteurs ont été signalés en tenant compte des conditions climatiques. Les provinces de Galapagos, Pichincha, Manabí, Santo Domingo de los Tsachilas et Napo a été sélectionnées pour faire un bilan de la situation des agents hémotropes (Tableau 1).

- Pour garantir la collecte d'échantillons de sang de bovins et de souches circulantes des agents hémotropes, nous avons procédé à des interventions dans les abattoirs de la province de Santo Domingo de los Tsachilas, où est également organisée la plus grande foire de bétail du pays, et dans l'abattoir de Quito, qui est le plus grand du pays. De plus, des animaux provenant de tout le pays sont sacrifiés dans ce dernier abattoir.

- La thèse s'est concentrée sur le bétail en tant qu'hôte, car la présence de ces agents hémotropes dans les exploitations agricoles entraîne des pertes économiques, et chez les mouches hématophages telles que les Tabanidae présentes dans certaines régions du pays, qui peuvent jouer un rôle important dans la transmission mécanique d'*A. marginale* et de *Trypanosoma* spp. Bien que les résultats de la thèse aient déjà été publiés sous forme d'articles dans des revues internationales, des posters scientifiques ont aussi été présentés lors de conférences internationales et locales, ce qui a permis de mettre en valeur les résultats auprès de la communauté scientifique. De plus, des protocoles ont été élaborés pour effectuer des tests diagnostic par PCR et la mise en place des traitements en cas de foyer. Grâce au transfert de technologie à travers des formations, ils ont été mis à la disposition de l'agence équatorienne AGROCALIDAD.

**Tableau 1 : Concordance entre les activités et les études réalisées dans le cadre de la thèse**

Objetifs	Type d'étude	Article
1. Identifier moléculairement et déterminer la prévalence de <i>Trypanosoma</i> spp et d'autres agent hémotropes ( <i>A. marginale</i> , <i>Babesia</i> spp) chez les bovins dans les provinces de Santo Domingo de los Tsachilas, Manabi, Pichincha et Galápagos.	Echantillons de sang de 151 bovins provenant de 15 fermes Zone d'étude : Province de Santo Domingo de los Tsáchilas.	<b>Étude 1:</b> PCR-diagnosis of <i>Anaplasma marginale</i> in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments
	Etude transversale Echantillons de sang de 264 bovins provenant de 20 fermes Zone d'étude : Province de Manabi	<b>Étude 3 :</b> Detection of <i>Babesia</i> spp. in High Altitude Cattle in Ecuador, Possible Evidence of the Adaptation of Vectors and Diseases to New Climatic Conditions
	Identification de foyer de <i>Babesia</i> spp. Echantillons de sang de 143 bovins dans une ferme Zone d'étude : Province de Pichincha	
	Etude transversale Echantillons de sang de 170 bovins provenant de 19 fermes	<b>Étude 5 :</b> First report of <i>Trypanosoma vivax</i> (Dutonella) in cattle from Galapagos Islands - Ecuador and its relationship with

	Zone d'étude : Ile de Santa Cruz-Galápagos	<i>Anaplasma marginale</i> and <i>Babesia</i> spp.
2. Caractériser les espèces de trypanosomes impliquées dans le foyer de trypanosomose bovine signalé dans la province de Manabí, à l'aide de méthodes moléculaires.	Identification de foyer de <i>T. vivax</i> Echantillons de sang de 20 bovins provenant de 3 fermes Zone d'étude : Province de Manabi.	Étude 2: First report and molecular identification of <i>Trypanosoma</i> ( <i>Duttonella</i> ) <i>vivax</i> outbreak in cattle population from Ecuador
3. Identifier moléculairement <i>T. theileri</i> chez les bovins provenant de deux abattoirs : Pichincha et Santo Domingo de los Tsáchilas et sa relation avec d'autres agent hématropes.	Echantillons de sang de 83 bovins Zone d'étude : Abattoir de Quito-Pichincha Echantillons de sang de 135 bovins Zone d'étude : Abattoir de Santo Domingo de los Tsachilas	<b>Étude 4 :</b> Molecular identification of <i>Trypanosoma theileri</i> (Laveran, 1902) in cattle from two slaughterhouses in Ecuador and its relation with other haemotropic agents
4. Identifier moléculairement de <i>Trypanosoma vivax</i> chez des vecteurs hématophages potentiels de trois régions de la partie continentale de l'Équateur.	Echantillons de sang de 180 bovins 6 mouches collectées Zone d'étude : Chone, province de Manabi.  Echantillons de sang de 75 bovins 2 mouches collectées Zone d'étude : Guayllabamba, Pichincha  Echantillons de sang de 46 bovins 3 mouches collectés Zone d'étude: foyers à Tena,- et Napo province	<b>Étude 6 :</b> Molecular identification of <i>Trypanosoma vivax</i> ( <i>Dutonella</i> ) in potential hematophagous vectors from three regions of the mainland of Ecuador

---

# **Chapitre 1**

## **Introduction**

---

## 1. Situation géographique de l'Équateur

L'Équateur est un pays de l'Amérique du Sud, avec une superficie de 283.560 km<sup>2</sup>. Il est traversé par la cordillère des Andes, qui le divise en trois régions géographiques : la Côte ou Littoral, la Sierra ou les Andes et l'Amazonie (Figure 1). Il possède également une région insulaire, à savoir les îles Galapagos. Le territoire équatorien est divisé en 24 provinces, 221 cantons et 1.499 paroisses. Les provinces de la région côtière sont Guayas, Manabí, Esmeraldas, El Oro, Los Ríos, Santo Domingo et Santa Elena. Celles de la région des Andes (Sierra) sont les provinces de Pichincha, Carchi, Tungurahua, Chimborazo, Cañar, Azuay, Loja, Imbabura, Bolivar et Cotopaxi. . Celles de la région amazonienne sont les provinces de Sucumbios, Orellana, Napo, Pastaza, Morona Santiago et Zamora Chinchipe. La région insulaire correspond à la province des Galápagos.

La région côtière, d'une longueur de 670 km et d'une largeur de 150 km, est située entre l'océan Pacifique et les contreforts de la cordillère des Andes, avec une altitude de 300 mètres et une température moyenne annuelle comprise entre 24 et 25°C. Cette région compte au total 24 écosystèmes, répartis en deux zones : la zone du Chocó, à prédominance humide, et la zone du Pacifique équatorial, à prédominance sèche (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013)

La région de la Sierra, d'une longueur de 800 km, se caractérise par le fait qu'elle est entièrement traversée par la cordillère des Andes, qui forme deux branches de montagnes séparées par 200 km entre lesquelles se trouvent les vallées inter-andines. Cette région possède un bioclimat pluvial et compte au total 45 écosystèmes, l'altitude varie de 300 à 6.310 m d'altitude, qui correspond au sommet du volcan Chimborazo. Les températures dans cette région varient en moyenne de 8 à 20°C (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013).

La région amazonienne a une superficie de 82.120 km<sup>2</sup> et représente 30 % du territoire national. Elle se caractérise par la présence de plaines composées de collines, de vallées et de plateaux couverts d'arbres, compte 22 écosystèmes et a été cataloguée comme l'une des régions les plus diversifiées du monde en termes de flore et de faune. Cette région est située à une altitude de 150 m d'altitude, correspondant aux plaines amazoniennes, mais peut atteindre 3.100 mètres d'altitude dans les chaînes montagneuses amazoniennes. La température moyenne est comprise entre 24-25°C (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2013).

L'archipel des Galápagos est composé d'environ 234 îles, îlots et rochers. Cinq îles (Isabela, Santa Cruz, Fernandina, Santiago et San Cristobal) représentent 93,2 % de la superficies totale de l'archipel. Isabela est la plus grande île avec 58,7% de la superficie. Au cours de l'année, il y a une saison chaude entre janvier et avril, au cours de laquelle la température oscille entre 26°C et 28°C, et une saison

froide pendant le reste de l'année au cours desquelles on enregistre des températures inférieures à 24°C (Consejo de Gobierno del Régimen Especial de Galápagos, 2016).

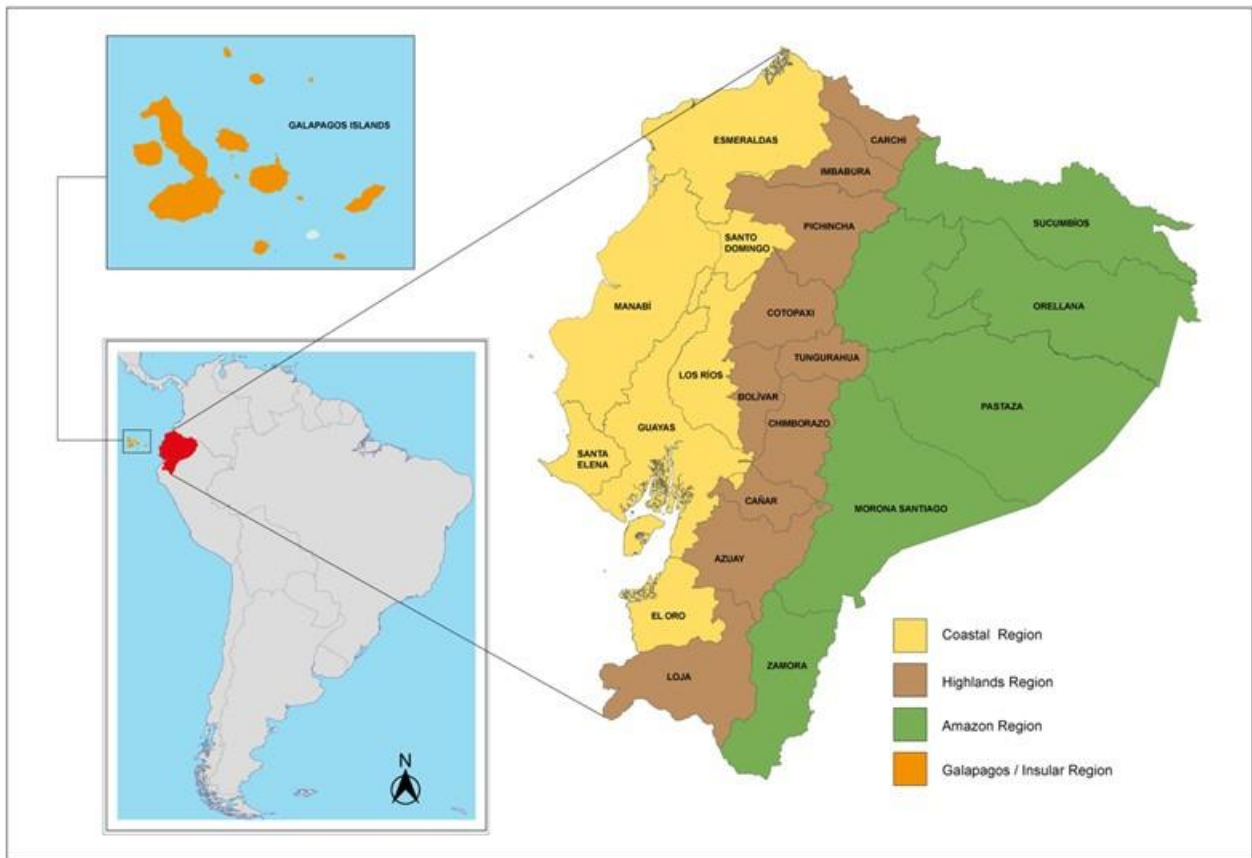


Figure 1. Régions géographiques de l'Équateur

## 2. Systèmes d'élevage bovin en Équateur

Dans le pays, l'activité agricole et l'élevage contribuent pour 8 % du PIB (115 milliards USD) ; l'élevage de bovins est l'activité d'élevage la plus importante du pays (INEC 2001). En 2022, la population bovine a été estimée à 3.9 millions de têtes, réparties dans les 3 régions : 53% du bétail se trouve dans la région de la Sierra, 38,5% dans la région de la Côte et 8,5% dans la région amazonienne (INEC, 2022). A cela s'ajoutent 10.000 bovins présents aux Galapagos (Consejo de Gobierno del Régimen Especial de Galápagos, 2016).

Le pays compte un total de 842.882 unités de production agricole (UPA) réparties sur une superficie de 12.355.820 hectares: 547.586 UPA sont considérées comme petites (jusqu'à 10 ha) et représentent 65% tandis que 117.1531 sont moyennes (jusqu'à 20 ha) et représentent 20,4%. Ces deux catégories se concentrent sur 21,3% de la surface agricole totale disponible. Les 12,6% de grandes UPA (20.01 à 100 ha) se concentrent sur 40,1% de la surface agricole et seulement 2% des "très grandes"

UPA (plus de 100 ha) couvrent 40,7% de la surface agricole disponible. Les UPA sont principalement gérées par des hommes (74,6%) et le reste par des femmes (INEC, 2008).

Parmi les 24 provinces d'Équateur, la province de Manabí, située dans la région côtière, est considérée comme la plus grande productrice de bétail (805.455 bovins) avec 20,9% du total national (INEC, 2022). Parmi les élevages que compte le pays, 70% se consacrent à la production mixte (lait et viande), 17% à la production de lait et 13% à la production de viande (Vinueza et al., 2022). La production laitière nationale journalière pour 2022 a été estimée à 5,5 millions de litres, avec un rendement de 6,8 litres/vache. Cette même année, la production laitière de la région andine représentait 4,4 millions de litres, suivie de la Côte avec 0,9 million de litres et de l'Amazonie avec 0,2 millions de litres (INEC, 2022).

Trois provinces jouent un rôle majeur dans la production de viande bovine. Il s'agit des provinces de Guayas, Pichincha et Santo Domingo. Dans cette dernière est organisée la plus grande foire de bétail du pays: entre 7.000 et 8.000 bovins y sont vendus chaque semaine pour la reproduction, l'engraissement, le remplacement ou l'abattage (Castillo Vélez, 2015).

Dans les zones rurales d'Équateur, l'élevage du bétail est important pour l'économie familiale. On estime, par exemple, que dans la province de Chimborazo (région de la Sierra), 98.3% des familles possèdent du bétail sur leur propriété (Chavez-Lindell et al., 2022) avec un nombre de bovins par exploitation qui varie de 1 et 8, la moyenne nationale étant de 15 bovins (Castillo Vélez, 2015). Une plus grande densité d'élevages se trouve dans la région de la Sierra, où ont été dénombrées jusqu'à 178 fermes par km (Vinueza et al., 2022). Cependant, à l'échelle nationale, la région côtière concentre 54,6 % de la superficie totale consacrées aux activités agricoles et d'élevage (INEC, 2022).

Dans les îles Galápagos, la production agricole est principalement destinée à la consommation locale. Dans cette province, 190 km<sup>2</sup> sont destinés aux UPA, ce qui représente 76% de la zone rurale de la province. Il existe environ 755 UPA, dont 47% se trouvent sur Santa Cruz, 34% sur l'île San Cristóbal, 17% sur Isabela et 2% sur l'île Floreana, 10.100 têtes de bétail se trouvent dans ces unités, dont 61% sont destinées à la production de viande et 39% à la production de lait (Castillo Vélez, 2015).

### **3. Situation des principales maladies hémotropes chez les bovins en Équateur**

En Equateur, les systèmes de surveillance et de contrôle concernent principalement les maladies zoonotiques et/ou transfrontalières, comme par exemple la brucellose, une maladie présente dans le pays où une technique ELISA compétitive a été utilisée pour déterminer une prévalences de 21,3 % au niveau du troupeau et de 6,2 % au niveau animal (Paucar et al., 2021) ou encore la fièvre aphteuse qui, en raison de la variabilité des souches en circulation et de l'absence de protection adéquate des souches

équatoriennes de terrain par le virus vaccinal utilisé, reste difficile à contrôler (Maradei et al., 2011). C'est pourquoi la lutte contre ces maladies reste une priorité de l'État dans les systèmes de production bovine.

Les maladies hémotropes (ayant un tropisme pour le sang) gagnent en importance, puisqu'ils pourraient être introduits dans de nouvelles régions, affectant non seulement les animaux mais aussi l'homme. Chez les bovins, des co-infections avec d'autres micro-organismes peuvent exister, ce qui détériore l'état de l'animal, rend leur diagnostic et leur contrôle difficiles ; le fait qu'elles soient transmises par de vecteurs, tant biologiques que mécaniques, favorise leur distribution.

Dans le pays, certaines études ont montré la présence d'agents hémotropes à transmission vectorielle, comme celle réalisée par Pesquera et al (2015) qui a démontré pour la première fois la présence d' *Anaplasma* spp. chez les tiques des genres *Amblyomma* spp. et *Rhipicephalus* spp. dans une zone d'élevage en Amazonie (Pesquera et al., 2015).

Une autre bactérie importante est *Coxiella burnetii*, qui induit le Fièvre Q et qui est zoonotique. Ses principaux réservoirs sont les chèvres, les moutons et les bovins, et elle peut être transmise entre les animaux par les tiques (Eldin et al., 2017). L'analyse d'un total de 2.668 échantillons de sang provenant de bovins laitiers et mixtes de 8 provinces de l'Équateur, a révélé une séroprévalence animaux de 12,6% (Carbonero et al., 2015). Une autre étude a estimé une séroprévalence chez les éleveurs de 43% et chez les travailleurs agricoles de 34% (Echeverría et al., 2019). Sur un total de sang de vaches ayant subi un avortement, une séroprévalence de 52,9 % a été mesurée pour *C. burnetii*. Dans cette même étude, aucune association n'avait pu être mise en évidence entre la séropositivité envers *Coxiella* spp. et l'avortement; une relation avait néanmoins été identifiée entre avortement et séroprévalence de *Neospora caninum* (Changoluisa et al., 2019).

Une autre maladie transmise par des petits moucheron du genre *Culicoides* est la fièvre catarrhale ovine ou maladie de la langue bleue. En raison de l'adaptation du vecteur à de nouvelles conditions climatiques, elle a été signalée au cours de l'année écoulée. En Équateur, on estime que la maladie est endémique dans le pays car des études sérologiques basée sur la technique ELISA ont montré une prévalence de 98.9 % de ce virus chez les bovins de deux exploitations situées dans la Sierra et dans la région de l'Amazonie (Verdezoto et al., 2018), une autre étude réalisée dans la province de Manabí a révélé une séroprévalence de 99 % dans les troupeaux de bovins (De La Torre et al., 2021).

L'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose sont des maladies transmises par des arthropodes. Les tiques sont les vecteurs biologiques de la transmission de *Babesia* spp. et d'*A. marginale* chez les bovins. En Équateur, deux espèces de tiques sont importantes pour le bétail, à savoir *Rhipicephalus microplus*, largement répandu dans les zones tropicales et subtropicales, et *Amblyomma*

*cajennense* sensu lato (s.l.), que l'on trouve principalement dans les zones côtières (Pérez-Otáñez et al., 2023)

Certaines études montrent cependant que ces arthropodes sont largement répandus dans le pays, puisqu'ils ont également été trouvés entre 570 et 2130 mètres d'altitude dans la province de Morona Santiago de la région de l'Amazonie (Ulloa Ramones, 2018). La tique *R. microplus* a aussi été signalée dans trois îles des Galapagos: Santa Cruz, San Cristobal et Isabela chez le bétail (Gioia et al., 2018). Dans une étude réalisée par Maya et al. (2020), les tiques *R. microplus* et *A. cajennense* sensu lato (s.l.) (au sens large ou général) ont été trouvées dans 83% et 21 % des élevages respectivement dans la province de Saint-Domingue (Maya-Delgado et al., 2020). Cette étude a aussi montré que 27% des tiques testées étaient positives pour *A. marginale*.

L'Équateur présente des conditions géographiques et climatiques nécessaires et favorables au développement de ces arthropodes. Récemment, la présence de trois autres tiques a été enregistrée en Amazonie : il s'agit d'*Amblyomma coelebs*, *Amblyomma longirostre* et *Amblyomma varium*, qui sont des vecteurs potentiels d'agents pathogènes tels que les *Rickettsias* spp. (Enríquez et al., 2020).

D'autres vecteurs importants impliqués dans la transmission mécanique d'*A. marginale* et de *Trypanosoma* spp. chez le bétail sont les mouches des familles Tabanidae et Muscidae, dont *Stomoxys calcitrans*. Les études de caractérisation et de distribution de ces insectes sont rares en Équateur. On estime que le pays compte 198 espèces de tabanidés et le taux d'endémisme est d'environ 12,6 % (fait référence à la proportion d'espèces endémiques présentes dans une certaine région géographique) ; les genres *Diachlorus*, *Di cladocera*, *Esenbeckia*, *Eristalotabanus* et *Leucotabanus* sont les plus représentés (Cárdenas et al., 2009).

Peu d'études ont étudié la présence d'agents hémotopes chez les bovins dans le pays, les données sont donc limitées ; une étude réalisée dans la province amazonienne de Zamora-Chinchipe a révélé une prévalence d'*A. marginale* de 63,8 % sur un total de 185 bovins, et a aussi permis de détecter la présence de différentes souches circulant dans les troupeaux étudiés (Guarnizo et al., 2020). Une autre étude réalisée dans la province amazonienne de Pastaza, reposant sur une technique ELISA indirecte, a révélé une séroprévalence de 65,5 % d'anticorps contre msp5 d'*A. marginale*, dans la même enquête une deuxième technique ELISA indirecte a été utilisée pour la détection de *Trypanosoma* spp, en utilisant un extrait soluble de *T. evansi* comme antigène. Cette technique a montré que 31,0% des bovins étaient positifs (Medina-Naranjo et al., 2017). Ces agents hémotopes ont également été introduits dans les îles Galapagos, où ils sont devenus présents de manière endémique. Ce pathogène est très répandu comme l'indique une séroprévalence troupeau de 93% mesurée sur trois îles de l'archipel (Gioia et al., 2018).

En Equateur, la trypanosomose bovine est une maladie peu connue tant des professionnels de la santé animale que des éleveurs de bétail. Cette maladie est probablement souvent confondue avec d'autres maladies hémotropes telles que l'anaplasmose à *A. marginale* et la babésiose (*Babesia* spp.), c'est pourquoi peu d'informations sont disponibles sur sa présence dans les systèmes de production bovine. Le premier rapport chez les bovins en Équateur date de 1977: Wells avait estimé une séroprévalence de 22,5% par immunofluorescence indirecte (Wells et al., 1977). Par la suite, une étude réalisée dans la province amazonienne de Pastaza en utilisant la technique ELISA indirecte, a révélé une séroprévalence pour *Trypanosoma* spp. de 31,03% (Medina-Naranjo et al., 2017). Une autre étude, bien qu'elle n'ait pas été réalisée chez des bovins, a mis ce parasite en évidence par la technique de microscopie à frottis sanguin chez deux moutons (sur un total de 100 analysés), dans le secteur de Colimes, province côtière de Guayas. Cette découverte constitue le premier rapport de *Trypanosoma* spp. chez des moutons en Équateur (Coello-Peralta et al., 2021). Dans une étude récente, 745 sérums bovins provenant de 7 provinces côtières et de 3 provinces amazoniennes ont été analysés par ELISA indirect, pour la détection des IgG anti-*Trypanosoma*, en utilisant comme antigène la protéine P64, qui a présenté une réaction croisée avec des parasites du sous-genre *Trypanozoon* et *T. vivax*. Les résultats a démontré une séroprévalence de 19,1 % pour *Trypanosoma* spp. (Maldonado et al., 2024).

#### 4. Races bovines en Équateur

Les premiers bovins de l'espèce *Bos taurus* à peupler le territoire équatorien proviennent de la péninsule ibérique. Ils ont été amenés en Amérique par Christophe Colom lors de son deuxième voyage en 1493 (Martínez et al., 2012). Ils ont été transportés depuis les îles des Caraïbes vers l'Équateur et le Pérou en passant par les ports de Panama et de Santa Martha, en Colombie (Villalobos-Cortés et al., 2015).

Les premiers bovins ont été introduits en Amérique du Nord et du Sud depuis l'Europe et l'Afrique à partir de 1492 (Martínez et al., 2012). Les preuves moléculaires de la domestication et de la dispersion du bétail proviennent de l'étude de l'ADN mitochondrial, que divise la plupart des bovins actuels en six haplogroupes: T1, T2, T3, T4 and I1 and I2, le T1 est prédominant en Afrique. Au Brésil et au Paraguay, un sous-groupe africain T1c1 a été découvert, ce qui prouverait une migration directe du bétail d'Afrique vers l'Amérique du Sud (Zhang et al., 2020). Des importations de zébus indiens au Brésil ont eu lieu au XVIIIe siècle (Medrado, 2018), et de ce pays, ils ont ensuite été emmenés vers d'autres pays d'Amérique et vers les États-Unis (Zhang et al., 2020).

A l'heure actuelle, l'Équateur compte plusieurs races de *Bos taurus* telles que la Holstein Frisonne (388.000 têtes), la Brune suisse (259.000 têtes) et la Jersey (122.000 têtes), et de *Bos indicus* avec la race Brahman (607.000 têtes). Cependant, les populations qui prédominent sont les métisses

avec 36,66% (1.491.000 têtes) de la population bovine nationale; la « criollo » représente 23,33% du cheptel global (949.000 têtes) (INEC, 2022).

Des études moléculaires menées sur cinq races indigènes d'Équateur (Macabea, Santa Elena, Manabí, Loja et Île Puna) ont pu mettre en évidence leur origine du Pacifique colombien à l'Amazonie, et du Panama et du Río de la Plata au reste du pays; elles présentent des caractéristiques de l'espèce *Bos taurus* (Delgado Bermejo et al., 2020). Ces races ont développé une capacité d'adaptation à différents écosystèmes. Par exemple, la race Macabea, qui se trouve dans la région amazonienne avec très peu d'introgession des races de zébus, a la capacité de s'adapter aux tropiques humides (Vargas et al., 2016).

## 5. Impact économique des maladies hémotropes sur la production bovine

Dans les zones tropicales et subtropicales des Amériques où *Anaplasma* spp, *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp. sont présentes, entraînent des pertes dans les systèmes de production bovine en raison d'une baisse de la production laitière, de la mortalité, des coûts associés à leur traitement et à leur contrôle (Rashid et al., 2019). Elles impactent également la commercialisation du bétail (Bock et al., 2004). En Tanzanie, les pertes annuelles dues aux maladies transmises par les tiques (anaplasmose, babésiose, cowdriose, thélériose) ont été estimées à 364 millions de dollars (Kivaria, 2006). Par ailleurs, l'Australie perd 16,9 millions de dollars par an en raison de la lutte contre la babésiose et l'anaplasmose (Bock et al., 2004).

Les tiques peuvent générer des pertes économiques, car elles peuvent affecter directement le bétail. L'infestation par ces arthropodes peut entraîner une perte du poids et de production, de l'anémie ainsi que du stress et des lésions cutanées liés aux piqûres ; de plus, la salive des tiques est toxique et les tiques peuvent transmettre des maladies dont les coûts associés au traitement ne sont pas négligeables (Garros et al., 2018).

Les pertes causées par la tique *R. microplus* suite à la perte de production de lait et de viande dans le cheptel bovin brésilien s'élèveraient à 3.24 millions de dollars (Grisi et al., 2014). On estime même que la lutte contre les tiques et les maladies qu'elles transmettent représente 60 % de l'ensemble des coûts générés dans les exploitations laitières de ce pays (Garros et al., 2018).

En Équateur, des estimations révèlent que les exploitations les plus technicisées dépensent moins en frais sanitaires pour la lutte contre les tiques (13,41%) que les exploitations semi-technicisées (23,97%) et non technicisées (32,49%) (Paucar-Quishpe et al., 2023).

En Uruguay, il a été démontré qu'un diagnostic adéquat des maladies transmises par les tiques : *A. marginale* et *Babesia* spp. permettait de réduire les coûts de traitement et d'établir des mesures adéquates pour contrôler un foyer. Associé à la mise en place de mesures de biosécurité et de

surveillance dans les exploitations, le diagnostic correct permettrait de réduire la probabilité de réintroduction de *R. microplus* dans les exploitations (Miraballes et al., 2019). Les pertes annuelles dues à la trypanosomose chez les bovins, ovins, caprins et porcins au Nigeria ont été estimées à 577,7 millions de dollars (Olalekan et al., 2021). Au Brésil, en 2008, lorsque le premier cas d'infection à *T. vivax* a été détecté dans une ferme laitière, une diminution de production laitière de 27 et 47 % a été estimée (Cuglovici et al., 2009).

En Colombie, on estime qu'un bovin infecté par *T. vivax* peut perdre 390 grammes par jour (Desquesnes, 2004). En Argentine, les pertes économiques associées à l'infection par *T. vivax* dans une ferme laitière s'élèveraient à 58.802 USD, ce montant ayant été évalué en prenant en compte les avortements, la mortalité des animaux, la vente d'animaux improductifs et les traitements (Abdala et al., 2021). Dans l'État de Goiás, au Brésil, la baisse de la production laitière a été estimée à 28,5 % suite à une épidémie de *T. vivax* au cours duquel un taux de mortalité de 22,7 % avait été enregistré (Bastos et al., 2017).

## **6. Description des principales maladies hémotropes des bovins présentes en Amérique du Sud**

### **6.1 Anaplasmose**

#### **6.1.1 Agent causal et taxonomie**

Le genre *Anaplasma* est composé de bactéries Gram négatives intracellulaire, qui ont une forme de coque ou d'ellipse, immobiles, et qui se répliquent dans des vacuoles liées à la membrane dans le cytoplasme des érythrocytes (Battilani et al., 2017).

En Amérique du Sud, *A. marginale* est l'espèce la plus pathogène et est responsable de l'anaplasmose bovine (Rar et al., 2021; Atif, 2015), et ne provoque pas de maladie chez l'homme (Aubry & Geale, 2011). La bactérie est distribuée dans les zones tropicales et subtropicales comme l'Amérique centrale et du sud. L'anaplasmose peut être endémique dans certaines régions (Suarez et al., 2019; Kocan et al., 2010).

#### **6.1.2 Taxonomie et principales espèces d'*Anaplasma* spp. qui affectent le bétail**

La taxonomie des principales espèces d'*Anaplasma* spp. qui affectent le bétail est présentée à la Figure 2.

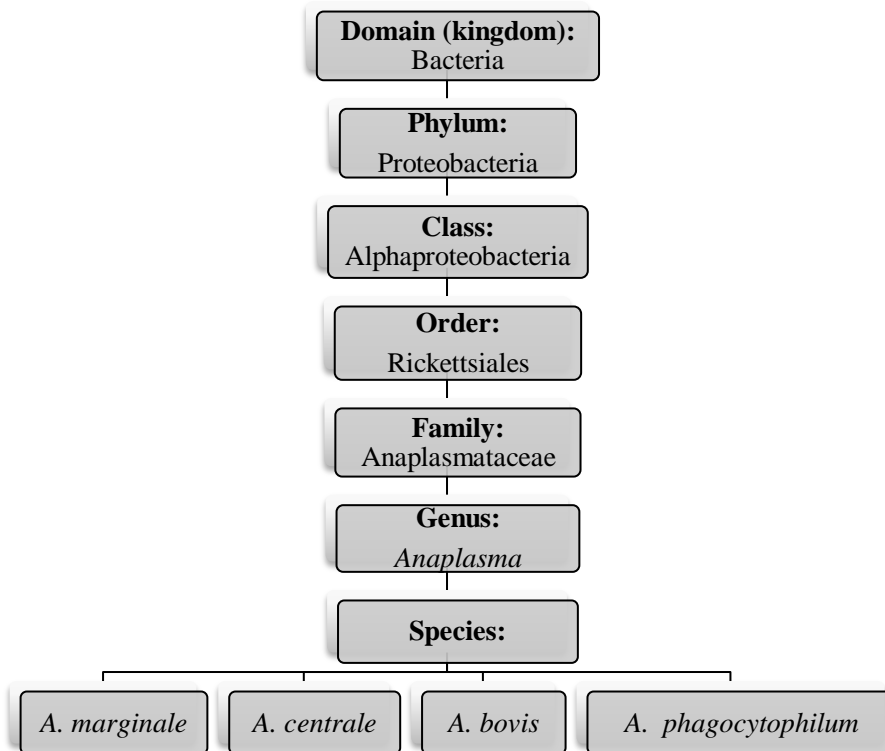


Figure 2. Taxonomie des principales espèces d'*Anaplasma* spp. qui affectent le bétail (Battilani et al., 2017; Atif, 2015; Kocan et al., 2010)

### 6.1.3 Transmission

La transmission mécanique d'*A. marginale* semble être un moyen efficace de propagation de la maladie puisqu'il existe des souches qui ne sont ni infectieuses ni transmissibles par les tiques (Suarez & Noh, 2011; Kocan et al., 2010). La transmission mécanique peut se faire par piqûre d'insectes tels que les mouches (Tabanidae, *Stomoxys*), les poux (*Haematopinus tuberculatus*) et par diverses espèces de moustiques. Une transmission par des vecteurs passifs contaminés par du sang tels que des aiguilles, des instruments chirurgicaux ou de castration est également possible (Rar et al., 2021; Kocan et al., 2010) Figure 3. En Amérique, il a été démontré que les mouches hématophages peuvent être des vecteurs efficaces de transmission mécanique. Dans les zones exemptes de tiques telles que le sud de l'Uruguay, la présence d'*A. marginale* a été démontrée dans 26,8 % spécimens de Tabanidae (26/98). Dans cette même étude, les auteurs ont conclu que les taons pourraient être d'importants vecteurs de cette bactérie chez les bovins (Rodrigues et al., 2022).

La transmission peut se faire par les tiques et plusieurs genres ont été signalés comme vecteurs: *Ixodes*, *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Haemophysalis*, *Hyalomma* et *Rhipicephalus* (Rar et al., 2021; Atif, 2015). Lorsque les tiques se nourrissent de sang qui contient des érythrocytes infectés par *A. marginale*,

la bactérie se réplique ensuite dans les cellules intestinales et les glandes salivaires de la tique (Kocan et al., 2010).

Une autre forme de transmission décrite chez le mammifère-hôte est la voie transplacentaire : les érythrocytes infectés passent le placenta et arrivent jusqu'au fœtus, sans amplification de la bactérie (Aubry & Geale, 2011). Bien que les veaux puissent naître sans signes cliniques, ils peuvent néanmoins propager la maladie en restant infectés de manière persistante par *A. marginale* (Rar et al., 2021).

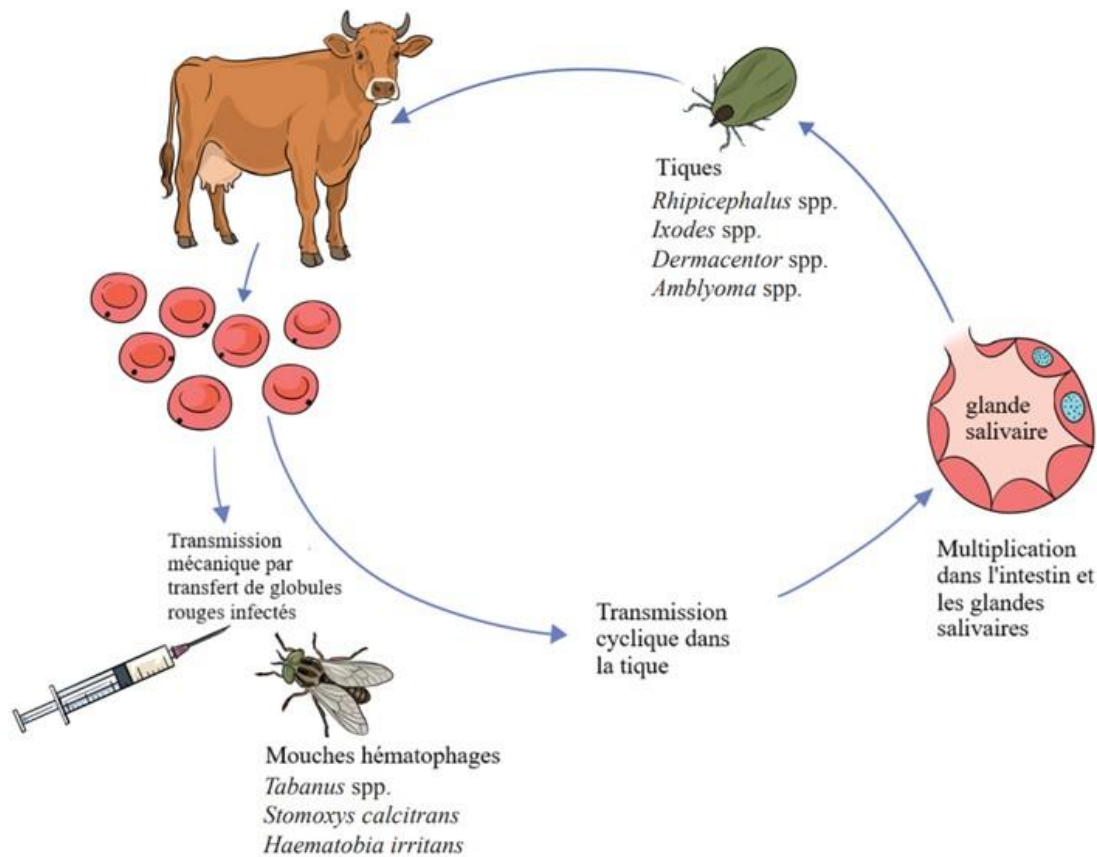


Figure 3. Transmission d'*Anaplasma marginale* chez les bovins

#### 6.1.4 Cycle biologique

Lorsque la tique se nourrit de sang contenant des érythrocytes infectés par *A. marginale*, la bactérie infecte les cellules intestinales de la tique ainsi que d'autres tissus tels que les glandes salivaires. Dans ces tissus, *A. marginale* se réplique au sein des vacuoles attachées aux membranes cellulaires. La première forme de développement est la forme réticulée ou végétative qui se divise par fission binaire, puis elle se transforme en forme dense ou infectieuse qui peut survivre à l'extérieur des cellules. La tique transmet la forme dense d'*A. marginale* à un bovin lors du repas sanguin, via les glandes salivaires (Kocan et al., 2002).

*A. marginale* infecte les érythrocytes (Aubry & Geale, 2011). Une fois dans ces cellules, les bactéries forment des inclusions ou corps initiaux qui adhèrent à la membrane érythrocytaire. Chaque inclusion peut contenir de 4 à 16 rickettsies. La réplication bactérienne se fait par fission binaire; en phase aiguë, jusqu'à 90 % des érythrocytes peuvent être infectés. Les érythrocytes sont reconnus par les cellules réticuloendothéliales et sont ensuite phagocytés (Rar et al., 2021; Aubry & Geale, 2011; Kocan et al., 2010).

Aux États-Unis, chez les tiques *Dermacentor andersoni* et *D. variabilis*, une transmission trans-stadiale d'*A. marginale* se produit. Ce sont des tiques à trois hôtes, c'est-à-dire que ce sont des tiques qui se nourrissent de bovins différents à chacune des trois étapes de développement : larve, nymphe et adulte pour compléter leur cycle, les tiques mâles jouent un rôle important dans la transmission. Dans le cas des tiques à hôte unique telles que *Rhipicephalus microplus* que se développe sur le même animal, dans ce cas également la tique mâle peut jouer un rôle important dans la transmission d'*A. marginale*, puisqu'elle peut changer d'hôte à la recherche de femelles lorsque les animaux sont proches les uns des autres (Aubry & Geale, 2011). Aucune transmission trans-ovarienne d'une génération à l'autre n'a été observée chez la tique (Kocan et al., 2010; Guglielmone, 1995).

### 6.1.5 Signes cliniques

Dans le cas de l'anaplasmose, lorsque 15 % des érythrocytes sont infectés, une maladie clinique peut survenir. Les signes cliniques chez les bovins sont associés à la gravité de l'anémie, caractérisée par des muqueuses pâles, une faiblesse, anorexie et léthargie. D'autres signes cliniques incluent la fièvre, la perte de poids, la diminution de la production de lait, l'avortement et la mort (Kocan et al., 2010).

Toutes les tranches d'âge sont sensibles à l'anaplasmose bovine (Atif, 2015) mais la prévalence d'*A. marginale* peut augmenter avec l'âge, les taux de mortalité chez les adultes varient de 50 à 60 % (Kocan et al., 2010) les animaux infectés le restent de manière persistante et peuvent devenir un réservoir à vie (Rar et al., 2021). A un stade avancé de la maladie, les animaux peuvent présenter des altérations gastro-intestinales associées à une déshydratation et une perte de poids, un ictère peut également être observé (Kocan et al., 2010).

## 6.2 Babésiose

### 6.2.1 Agent causal et taxonomie

La babésiose est une maladie causée par un protozoaire appartenant au phylum Apicomplexa, caractérisé par la présence d'un complexe apical. À l'intérieur des érythrocytes de l'hôte, les protozoaires sont observés dans la phase mérozoïte intracellulaire (Chauvin, 2009). Deux espèces peuvent affecter le bétail en Amérique du sud, à savoir *Babesia bovis* et *B. bigemina* (Bock et al., 2004).

## 6.2.2 Taxonomie et principales espèces de *Babesia* affectant le bétail en Amérique du Sud

La taxonomie des principales espèces de *Babesia* spp. qui infectent le bétail en Amérique du Sud est présentée à la Figure 4.

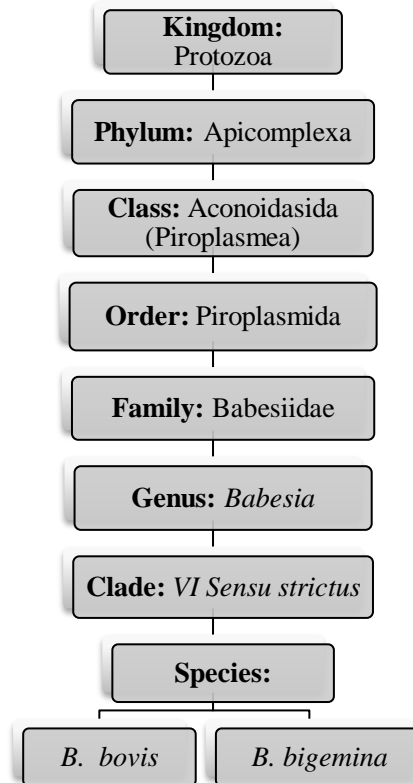


Figure 4. Taxonomie des principales espèces de *Babesia* spp. qui infectent le bétail en Amérique du Sud

(Homer et al., 2000; Jalovecka et al., 2019; Schnittger et al., 2022)

## 6.2.3 Transmission

En Amérique du Sud, *B. bovis* et *B. bigemina* sont transmises par des tiques dures de la famille des *Ixodidae* et dans les zones tropicales et subtropicales, par la tique *Rhipicephalus microplus* qui est endémique (Benavides et al., 2016) et spécifique à son hôte bovin (Chauvin et al., 2009). La forte prévalence signalée sur le continent (64 %) est principalement due à la large répartition des tiques favorisée par les conditions agro-bioclimatiques (Jacob et al., 2020).

*Rhipicephalus microplus* est une tique à hôte unique, où tous les stades de développement (larves, nymphes et adultes) se déroulent sur le même animal. Les larves sont libérées des œufs déposés dans le sol, puis elles adhèrent à un hôte et fabriquent deux mues, devenant d'abord une nymphe puis un

adulte. Ensuite, les femelles se nourrissent et se détachent de l'hôte et pondent des centaines d'œufs dans l'environnement (Shulman, 2023).

#### 6.2.4 Cycle biologique

Le cycle de vie de *Babesia* spp. comporte deux phases dont la première est asexuée et se développe dans les érythrocytes de l'hôte vertébré (Bock et al., 2004). Les sporozoïtes, formes infectantes, sont introduits dans la circulation sanguine par la salive de la tique et pénètrent dans les érythrocytes, où ils se répliquent par fission binaire des parasites apicomplexes en deux mérozoïtes (Elsworth & Duraisingh, 2021). Lorsqu'ils quittent l'érythrocyte infecté (par intermittence) pour infecter d'autres érythrocytes, les mérozoïtes provoquent la lyse cellulaire (Beugnet & Moreau, 2015; Chauvin et al., 2009; Mosqueda et al., 2012). La taille et l'emplacement du mérozoïte dans l'érythrocyte dépendront de l'espèce: dans le cas de *B. bigemina*, par exemple, ils sont longs, tandis que dans le cas de *B. bovis* les mérozoïtes sont plus petits (Chauvin et al., 2009).

Lorsque la tique se nourrit du sang de l'hôte, les érythrocytes infectés pénètrent dans l'intestin moyen de la tique, où ils stimulent le développement des gamétocytes, déclenchant ainsi la phase sexuelle (Bock et al., 2004; Chauvin et al., 2009). Les gamétocytes se différencient en gamètes mâles et femelles, formant un zygote qui pénètre dans les cellules de l'intestin des tiques et donnent naissance à des kinètes mobiles. Ces derniers rejoignent ensuite l'hémolymphe en provoquant la destruction des cellules intestinales et passent dans les ovaires où ils infectent les cellules embryonnaires (transmission trans-ovarienne) (Mosqueda et al., 2012). Selon la classification phylogénétique utilisant le gène ARN 18S, il s'agit d'une caractéristique exclusive de *Babesia* sensu stricto (Jalovecka et al., 2019) Figure 5.

Le cycle sexuel à l'intérieur du vecteur est décrit à tous les stades de développement des tiques, ce qui facilite la persistance à long terme des espèces de *Babesia* dans l'écosystème (Suarez et al., 2019). Après éclosion, les kinètes migrent vers les glandes salivaires des larves, se transforment en stades multinucléés (sporogonie) et forment ensuite des sporozoïtes. Le développement des sporozoïtes se produit lorsque les larves de tiques se nourrissent de sang de l'hôte (Beugnet & Moreau, 2015; Mosqueda et al., 2012). Dans le cas de *B. bigemina*, le développement des sporozoïtes infectieux peut durer de 6 à 12 jours, c'est pourquoi seuls les stades nymphal et adulte sont produits. Dans le cas de *B. bovis*, les sporozoïtes se forment dans les 2 à 3 jours suivant la fixation de la larve, mais les larves peuvent être stimulées par la température ambiante lorsqu'elle augmente; elle permet une transmission immédiate lorsque les larves adhèrent à l'hôte (Bock et al., 2004, Suarez et al., 2019).

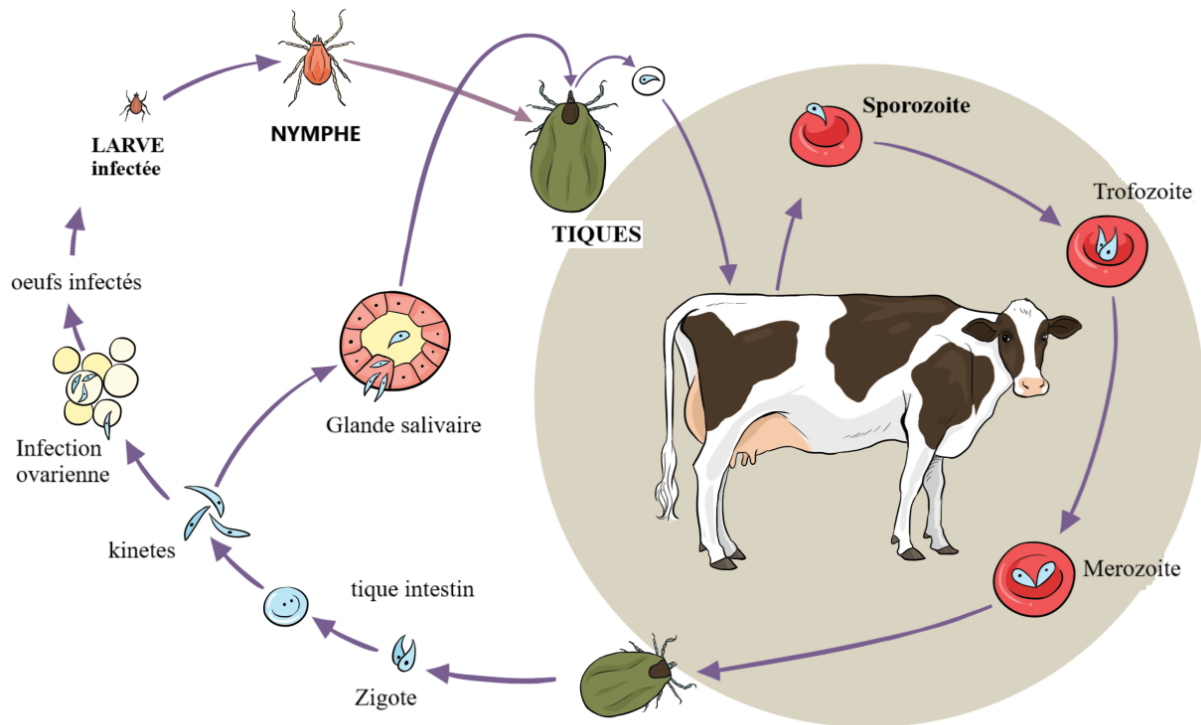


Figure 5. Cicle de *Babesia* spp. chez les bovins

### 6.2.5 Signes cliniques

Les bovins infectés de manière persistante ne présentent pas de signes cliniques, mais lorsqu'ils sont soumis à des conditions de stress, à des co-infections avec d'autres agents pathogènes ou qu'ils sont immunodéprimés, l'immunité peut être rompue et l'animal peut tomber malade (Suarez et al., 2019).

Les signes cliniques chez les animaux infectés par *B. bovis* peuvent être causés par une surproduction de cytokines et d'autres agents qui contribuent à la progression de la maladie. L'animal peut présenter des signes cliniques tels que vasodilatation, hypotension, augmentation de la perméabilité capillaire, œdème, collapsus vasculaire, troubles de la coagulation, lésions endothéliales et stase circulatoire au niveau du cerveau et des poumons, causant des signes nerveux et un syndrome de détresse respiratoire (Saegerman et al., 2003; Bock et al., 2004; Suarez et al., 2019).

Une anémie hémolytique (destruction des érythrocytes entraînant une diminution du nombre d'érythrocytes circulants) et une diminution de l'hématocrite surviennent à mesure que la maladie progresse. L'animal peut présenter de l'apnée, des problèmes respiratoires et de la fièvre, ainsi qu'une perte d'appétit, de la dépression, une augmentation de la fréquence respiratoire, de la faiblesse et une réticence à bouger, ; la maladie aiguë peut évoluer sur 3 à 7 jours (Bock et al., 2004). Lors d'infection à

*B. bovis*, les animaux présentent des signes neurologiques, accompagnés de processus inflammatoires sévères et de lésions tissulaires (Saegerman et al., 2003; Suarez et al., 2019).

La présence de signes cliniques de babésiose est également liée à l'âge, les jeunes animaux étant plus résistants que les adultes (Bock et al., 2004; Chauvin et al., 2009; Suarez & Noh, 2011). Dans les régions où les tiques sont abondantes, les jeunes animaux (moins de 9 mois) sont exposés précocement au protozoaire, ce qui leur permet d'être plus résistants à l'infection par *Babesia* spp. (Benavides et al., 2016).

Lors d'infection à *B. bigemina*, les animaux peuvent présenter une hémolyse intravasculaire rapide et massive, avec de l'hémoglobinurie. La fièvre est moins fréquente et il n'y a pas de signes cliniques nerveux, et la récupération est très rapide et complète. Cependant, certains animaux peuvent développer une anémie sévère et un ictère pouvant induire la mort de l'animal. Dans le cas où les animaux récupèrent d'une infection à *Babesia* spp., ils restent porteurs asymptomatiques. Dans le cas de *B. bovis*, ce portage peut durer plusieurs années tandis que dans le cas de *B. bigemina*, les animaux restent porteurs pendant quelques mois. Les animaux infectés par *B. bigemina* guérissent généralement rapidement et complètement (Bock et al., 2004; Suarez et al., 2019).

### 6.3 Trypanosomose

#### 6.3.1 Agent causal et taxonomie

Les trypanosomes sont classés en deux groupes selon le site de réplication chez l'hôte invertébré : le groupe « salivaire » se développe dans l'intestin antérieur et se transmet par inoculation, tandis que ceux du groupe « stercoraire » se développent dans l'intestin postérieur et se transmettent par contamination fécale de lésions ou des muqueuses (Magri et al., 2021).

En Afrique, certaines espèces du groupe salivaria provoquent une maladie chez les bovins et autres animaux, connue sous le nom de « Nagana », qui est principalement causée par *T. (Duttonella) vivax*, *T. (Nannomonas) congolense* et *T. (Trypanozoon) brucei brucei*. D'autres sous-espèces zoonotiques importantes pour la santé humaine et animale, telles que *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense*, sont présents chez les humains, les bovins et les porcs (Magri et al., 2021, Maguez et al., 2021). *T. evansi*, du groupe salivaire, affecte un grand nombre d'espèces animales sauvages et domestiques et provoque la maladie appelée « surra » ou « mal de caderas ». Contrairement à d'autres espèces salivaires en Afrique, elle ne se développe pas chez son vecteur (Desquesnes, 2004).

Au sein du groupe des stercoraires, *T. theileri* est classée comme une espèce légèrement pathogène qui infecte généralement les ruminants, tant domestiques que sauvages. Une autre espèce de

ce groupe est *T. cruzi*, responsable de la maladie chez l'homme connue sous le nom de « maladie de Chagas », que l'on trouve en Amérique (Magri et al., 2021, Maguez et al., 2021).

### 6.3.2 Taxonomie et principales espèces de *Trypanosoma* chez les bovins en Amérique du Sud

En Amérique du Sud, les bovins peuvent être affectés par trois espèces à savoir *T. vivax*, *T. evansi* et *T. theileri*. La taxonomie des principales espèces de *Trypanosoma* chez les bovins est présentée à la Figure 6.

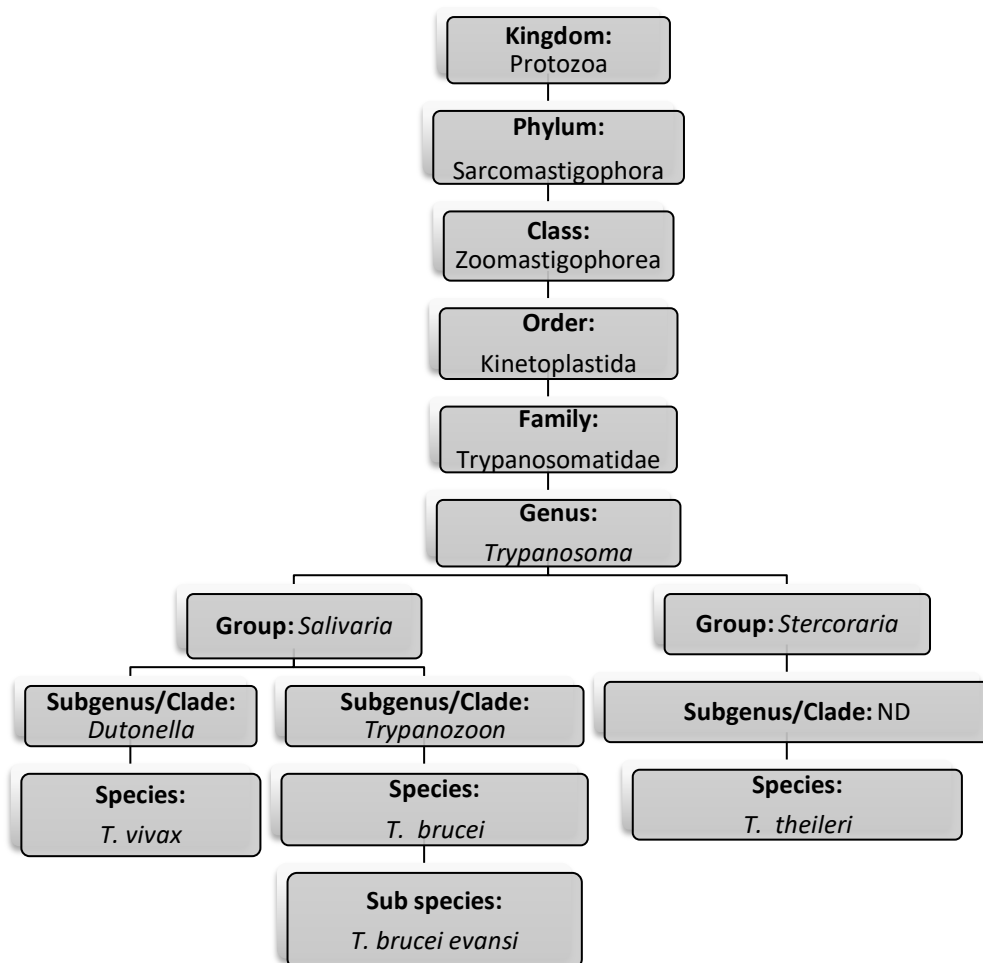


Figure 6. Taxonomie des principales espèces de *Trypanosoma* spp. qui infectent le bétail en Amérique du sud (Desquesnes, 2004; Magri et al., 2021).

### 6.3.3 Transmission

En Afrique, certains trypanosomes complètent leur cycle de vie à l'intérieur de la mouche tsé-tsé, comme c'est le cas de la sous-espèce de *T. brucei* et c'est aussi le mode de transmission pour *T.*

*congolense* et *T. vivax*, cependant cette dernière peut également être transmise par voie mécanique (Maguez, et al., 2021).

En Amérique, la transmission de *T. vivax* est mécanique par les mouches hématophages telles que taons (*Tabanidae*) et les mouches des étables (*Stomoxys* spp.) (Osório et al., 2008). D'autres mouches/moucheron pourrait être des vecteurs mécanique potentiels comme les Culicoïdes (*Ceratopgonidae*), les *Haematobia* et d'autres insectes comme *Culex*, *Mansonia* et *Aedes* (Desquesnes, 2004). De plus, d'autres animaux consommateurs de sang comme les chauves-souris (Magez et al., 2021) peuvent aussi transmettre le parasite par voie mécanique (Desquesnes, 2004). *T. vivax* peut également être transmis par voie iatrogène par la seringue. *T. vivax* peut avoir une transmission transplacentaire chez les bovins (Desquesnes, 2004; Osório et al., 2008) Figure 7.

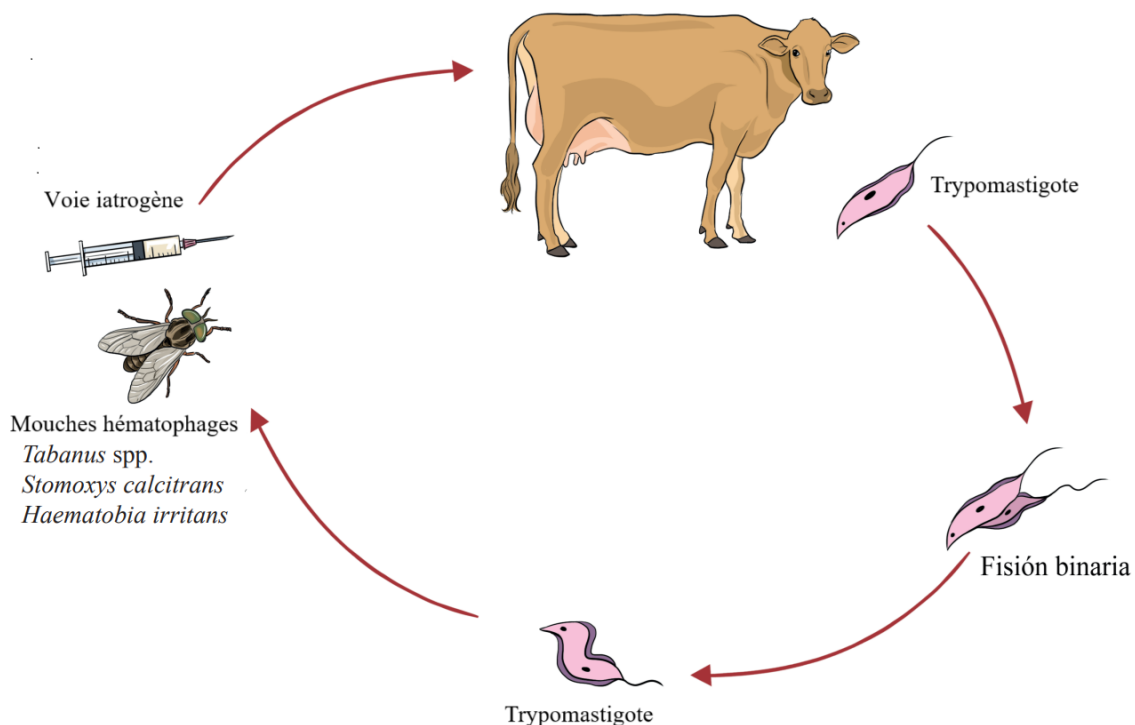


Figure 7. Transmission de *Trypanosoma vivax* chez les bovins

Le succès de la transmission mécanique de *T. vivax* dépend de plusieurs conditions simultanées telles qu'une parasitémie élevée chez les porteurs, l'abondance des vecteurs, la disponibilité des hôtes, ce qui explique que la transmission ne se produit pas chaque année, mais uniquement lorsque ces caractéristiques sont réunies, des épizooties peuvent se produire (Osório et al., 2008).

La transmission de *T. evansi* est mécanique par les piqûres d'insectes, les mouches suceuses peuvent également transmettre des trypanosomes par contamination d'une plaie. Des transmissions

iatrogènes causées par l'utilisation d'instruments chirurgicaux ou d'aiguilles non stériles et transplacentaire sont également décrites. La transmission orale chez les carnivores lors de la consommation de viande crue contaminée peut introduire le parasite par des lésions de la muqueuse buccale. Cependant, une contamination oro-digestive est également décrite via des chauves-souris vampires, puisque le parasite peut survivre et traverser la muqueuse buccale, l'œsophage et la muqueuse gastrique (Desquesnes, et al., 2013).

Les taons sont d'importants vecteurs en Amérique, comme démontré dans une étude réalisée au Brésil où l'ADN de *T. evansi* a été isolé de l'appareil alimentaire des espèces *Dichelacera alcicornis* et *D. januarii*. Il a également été démontré que *D. alcicornis* était l'espèce de taons la plus abondante, représentant 52.7% du total des spécimens collectés (N=523). D'autres espèces sont également représentées telles que *Chrysops fuscipex* (18.0%) et *Chrysops patricia* (10.7%) (Ramos et al., 2023).

*T. theileri* peut avoir une large gamme de vecteurs mécaniques. Cela a été démontré dans une étude menée en République Tchèque où une prévalence de 47 à 91% a été détectée chez les moustiques, principalement chez le genre *Aedes* spp., dont *Ae. excrucians* (22%), *Ae. perforateur* (21%) et *Ae. Cantans anulipes* (10 %) présentaient la prévalence la plus élevée. *Trypanosoma theileri* a également été retrouvée chez les phlébotomes (genre *Phlebotomus*) dans 65% des insectes analysés (Brotánková et al., 2022). Dans une étude réalisée en Colombie, des trypanosomes ont été détectés par PCR dans 66,7% (26/39) des échantillons de sang de chauves-souris (chiroptères) ; parmi ces échantillons, 61,5% appartenaient à l'espèce *T. theileri* (24/39). La probable voie d'infection des chauve-souris était l'ingestion d'arthropodes infectés (Jaimes-Dueñez et al., 2020). Des transmission iatrogènes et transplacentaire ont également été décrites (Brotánková et al., 2022; Desquesnes, 2004; Jaimes-Dueñez et al., 2020) (**Tableau 2**).

L'infection par *T. cruzi* peut provoquer une maladie clinique chez les chiens, les chats et les jeunes porcs. Le parasite se transmet au bétail par l'ingestion d'insectes triatomes, ou de leurs excréments, ou encore par la consommation d'aliments contaminés par les excréments d'opossums (*Didelphis marsupialis*) (Desquesnes, 2004).

**Tableau 2. Voies de transmission d'*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp. chez les bovins en Amérique du Sud**

(Aubry &amp; Geale, 2011; Benavides et al., 2016; Bock et al., 2004; Brotánková et al., 2022; Desquesnes, 2004; Jaimes-Dueñez et al., 2020; Rar et al., 2021; Suarez &amp; Noh, 2011)

Mode de transmission	Agent hémotrope					
	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Trypanosoma vivax</i>	<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Trypanosoma theileri</i>
<b>Biologique</b>	<b>Tiques</b> <i>Rhipicephalus</i> <i>Ixodes</i> <i>Dermacentor</i> <i>Amblyomma</i> , <i>Haemophysalis</i> <i>Hyalomma</i>	<b>Tiques</b> <i>Rhipicephalus microplus</i>	<b>Tiques</b> <i>Rhipicephalus microplus</i>	ID	ID	<b>Mouches</b> <i>Tabanidae</i> **
<b>Mécanique</b> Insectes et animaux hématophages	<b>Mouches</b> <i>Tabanidae</i> <i>Stomoxys</i> <b>Poux</b> <i>Haematopinus tuberculatus</i>	ID	ID	<b>Mouches</b> <i>Tabanidae</i> <i>Stomoxys</i> <i>Haematobia</i> , <i>Culicidae</i>	<b>Mouches</b> <i>Tabanidae</i> <i>Stomoxys</i> <b>Chauves-souris</b> <i>Desmodus rotundus</i> ( <i>mordedura</i> )	<b>Tiques</b> <i>Hyalomma</i> <b>Mouches</b> <i>Tabanidae</i> <i>Stomoxys</i> <u>Vecteurs potentiels:</u> <b>Moustiques</b> <i>Aedes</i> <b>Phlébotomes</b> <i>Phlebotomus</i> spp. <b>Chauves-souris</b> <i>Chiroptera</i> <b>Per-oral</b> (Consommation de mouches infectées)
<b>Mécanique</b> Iatrogène (aiguilles, instruments chirurgicaux et de stérilisation contaminés)	OUI	ID	ID	OUI	OUI	OUI
<b>Transplacentaire</b>	OUI	ID	ID	OUI	OUI	OUI

Légende : ID, indéterminé.

### 6.3.4 Cycle biologique

En Afrique, le principal vecteur de la trypanosomose animale est la mouche tsé-tsé, appartenant à l'ordre des Diptères et à la superfamille des Hippoboscidea, se trouve exclusivement sur le continent africain. Ces mouches, qui font partie du genre *Glossina*, sont des insectes hématophages, les mâles et les femelles ont besoin d'un repas de sang tous les 3 ou 4 jours (Magez & Radwanska, 2014).

Dans la circulation sanguine de l'hôte, les parasites se différencient en parasites longs et minces (forme proliférative) et en parasites courts et trapus (non prolifératifs). Lorsque la mouche tsé-tsé consomme du sang, la forme courte est essentielle à la continuité de son cycle de vie. En atteignant le système digestif de la mouche, il se transforme rapidement en trypomastigotes procycliques, qui se multiplient ensuite par fission binaire. Les parasites se déplacent alors vers le ventricule et deviennent des épimastigotes qui migrent ensuite vers les glandes salivaires de la mouche tsé-tsé, où ils se différencient en trypomastigotes métacycliques infectieux. Le cycle est terminé en trois semaines environ (Maguez et al., 2021).

Les trypanosomes africains tel que *T. brucei* ont un cycle qui dépend du glucose de l'insecte vecteur (glossine) et d'une mitochondrie fonctionnelle, qui réalise la phosphorylation oxydative. Chez l'hôte, elles prolifèrent en raison de la grande quantité de nutriments dans le sang. Dans le cas des souches de *T. vivax* d'Amérique du Sud, le cycle est simplifié. En effet, on a pu observer que les mitochondries du kinétoplaste avaient subi un processus de dégradation qui avait facilité leur adaptation sur ce continent (Greif et al., 2015).

En Amérique du Sud, en raison de sa transmission mécanique, *T. vivax* peut passer d'un hôte vertébré à un autre, sans croissance ni multiplication. Ainsi, si la transmission mécanique se produit par des mouches qui se nourrissent de plusieurs animaux avant d'être rassasiées et restent infectieuses pendant une courte période (Osório et al., 2008). Lorsque les formes métacycliques (développées et infectieuses) appelées trypomastigotes atteignent la circulation sanguine de l'animal vertébré, elles se répliquent par fission binaire (Dagnachew & Bezie, 2015).

Dans le cas de *T. evansi*, la perte de l'ADN du kinétoplaste (ADNk), essentiel au développement du parasite dans l'intestin de la glossine en Afrique, a favorisé la transmission mécanique et donc sa propagation sur plusieurs continents, y compris sur le continent américain (Magez et al., 2021).

Le cycle de *T. theileri* est typiquement celui du groupe Stercoraria qui est caractérisé par une contamination des plaies par les excréments des tabanidés. Chez les bovins, les formes adultes (épimastigotes) se trouvant dans le sang donnent naissance par fission binaire à des trypomastigotes. Lorsque le taon se nourrit, ces formes se répliquent dans l'intestin de la mouche et sont ensuite libérées

par les excréments. Le parasite pénètre ensuite par les blessures provoquées par les piqûres de tabanidés. Les insectes peuvent également être écrasés à proximité des lésions ou être ingérés par le bétail, permettant ainsi la transmission des protozoaires (Desquesnes, 2004).

Dans le cas de *T. cruzi*, ainsi que du groupe *Stercoraria*, le cycle comprend plusieurs étapes tant chez l'insecte vecteur (*Triatoma*, *Rhodnius* ou *Panstrongylus*) que chez le mammifère hôte (y compris l'homme, animaux domestiques et sauvages). Elle se caractérise par une alternance de formes de vie extracellulaires et intracellulaires, qui varient en fonction de l'environnement dans lequel elles se trouvent. Le cycle commence lorsque l'insecte se nourrit du sang d'un mammifère infecté, en ingérant des trypomastigotes (la forme extracellulaire mobile du parasite) qui circulent dans le sang de l'hôte. Une fois dans l'intestin moyen de l'insecte, les trypomastigotes se transforment en épimastigotes, qui se multiplient ensuite par fission binaire et se différencient dans l'intestin postérieur de l'insecte en trypomastigotes métacycliques, la forme du parasite qui infecte le mammifère. Ces trypomastigotes métacycliques sont libérés avec les fèces de l'insecte lorsqu'il défèque sur des lésions cutanées ou à proximité des muqueuses de l'hôte pendant qu'il se nourrit (Kessler et al., 2017).

### 6.3.5 Signes cliniques

Les bovins infectés par ces agents hémotropes peuvent présenter des infections subcliniques, des signes cliniques non spécifiques et une absence de parasitémie, ce qui rend le diagnostic clinique difficile (Desquesnes, 2004). Les réponses cliniques dépendent cependant de la pathogénicité du parasite, de la sensibilité de l'hôte, de la réponse immunitaire et des antécédents médicaux de l'hôte. De plus, chez les bovins, il peut y avoir des co-infections entre ces micro-organismes, les animaux peuvent présenter des signes cliniques ce qui complique le diagnostic (Desquesnes et al., 2022; Jaimes-Dueñez et al., 2017). Dans le cas de la trypanosomose, la pathogénicité de l'infection dépend de certains critères tels que : l'espèce et la virulence du parasite, l'hôte (espèce, race, âge, statut immunologique, état nutritionnel, présence de co-infection et condition physique), la situation épidémiologique (endémique ou épidémique) et l'environnement (disponibilité de nourriture et d'eau ainsi que saison de l'année) (Giordani et al., 2016).

La trypanosomose causée par *T. vivax* chez les bovins est plus grave que lors des infections causées par les autres espèces de *Trypanosoma* spp. En Amérique du Sud, les animaux de plusieurs foyers rapportés au Brésil ont présenté des signes cliniques de maladie, dont les plus courants étaient : l'anémie, le manque d'appétit, la diminution de la production de lait, la perte de poids, la faiblesse, l'avortement, la diarrhée et des signes neurologiques (Costa et al., 2020). Les autres signes cliniques observés lors de ces épidémies étaient de l'apathie, des muqueuses pâles, de la tachycardie, de la tachypnée, de la diarrhée, de la déshydratation, un larmolement et de l'énophtalmie (Bastos et al., 2017;

De Souza Pimentel et al., 2012; Vieira et al., 2017). La période pré patente peut varier en fonction de la charge parasitaire dans l'inoculum et de la virulence de la souche (Desquesnes, 2004).

*Trypanosoma theileri* est considéré comme non pathogène pour les bovins. Cependant, comme il s'agit d'un parasite opportuniste, il peut être isolée lors de co-infections avec d'autres agents hématogènes tels que *T. vivax*, *T. evansi*, *A. marginale* et *Babesia* spp. Dans ce cas précis, une parasitémie élevée ainsi qu'une anémie sévère accompagnée d'ictère peuvent être observés (Desquesnes, 2004; Jaimes-Dueñez et al., 2017).

Les signes cliniques chez les bovins atteints de *T. evansi* en Amérique du Sud ne sont pas évidents (Desquesnes, et al., 2013). En termes de bilan sanguin, une diminution de l'hématocrite a été observée sans autres signes cliniques apparents associés à la maladie (Ramírez-Iglesias et al., 2017). Cependant, chez d'autres espèces animales, les chameaux et les chevaux sont plus sensibles à *T. evansi*, tandis que les ânes et les mulets sont moins sensibles. Dans le cas des chevaux, des symptômes tels que fièvre, faiblesse, léthargie, anémie, perte de poids importante, avortement, altérations de la locomotion et œdème ont été observés. Les chiens sont très sensibles à *T. evansi* et des symptômes tels qu'un œdème de la tête, de la paroi abdominale et des pattes, ainsi qu'une anémie, une faiblesse, une parésie de l'arrière-train et une myocardite ont été observés chez ces animaux (Desquesnes et al., 2013).

Les souches asiatiques de *T. evansi* peuvent provoquer de la fièvre, une perte de poids, de l'anémie, une diminution de la production de viande et de lait, des lésions du système nerveux, des avortements et finalement la mort chez les bovins (Desquesnes, 2004; Desquesnes et al., 2013). Le Tableau 3 résume la pathogénèse et les signes cliniques des maladies hémotropes chez les bovins.

**Tableau 3. Agents hémotropes et signes cliniques chez les bovins affectés par *A. marginale*, *Babesia* spp et *T. vivax* en Amérique du Sud**  
(Kocan et al., 2002; Quiroz-Castañeda et al., 2016; Rar et al., 2021) (Bock et al., 2004; Suarez et al., 2019; Suarez & Noh, 2011) Bastos et al., 2017; Cuglovici et al., 2010; Desquesnes, 2004; Florentin et al., 2022; Magez & Radwanska, 2014)

Paramètres	Agents hémotropes			
	<i>Anaplasma marginale</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Babesia bigemina</i>	<i>Trypanosoma vivax</i>
<b>Localisation chez l'hôte</b>	Intra érythrocytaire	Intra érythrocytaire	Intra érythrocytaire	Intravasculaire et extravasculaire (ganglions lymphatiques, yeux et liquide céphalo-rachidien)
<b>Âge des animaux pouvant être concernés</b>	Animaux de tous âges, jeunes animaux plus résistants	Jeunes animaux sont plus résistants	Jeunes animaux plus résistants	Animaux de tous âges
<b>Pathogénie</b>	Elle se réplique dans l'érythrocytes, le système réticuloendothélial élimine les érythrocytes infectés, puis une ré-infestation de nouveaux érythrocytes se produit.	Les érythrocytes infectés adhèrent aux cellules endothéliales vasculaires et s'accumulent dans la micro-vascularisation (cerveau, poumon et rein) pour éviter la phagocytose au niveau de la rate, médiée par des modifications de la surface cellulaire formant des crêtes qui interagissent avec les cellules endothéliales, favorisant l'établissement d'infections persistantes.	Ne séquestre pas les érythrocytes dans le système microvasculaire. L'augmentation des parasitémies contribue à une capture accrue des parasites par la rate, entraînant une augmentation de la concentration en hémoglobine, des lésions rénales et une hémoglobinurie.	Les parasites sécrètent des trans-sialidases qui déshyalinisent les érythrocytes, stimulant ainsi l'érythrophagocytose. Le facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF), également sécrété par ces flagellés hémotropes, bloquent l'érythro-poïèse et la maturation des globules rouges. Le dépôt de complexes immuns à la surface des érythrocytes déclenche l'érythrophagocytose

Période prépatente	7 à 60 jours	6 à 12 jours après la fixation de la tique	12 et 18 jours après la fixation de la tique	2 à 10 jours
<b>Signes cliniques</b>	Hyperthermie >40 °C Anémie Muqueuses pâles Faiblesse Anorexie Léthargie Faible production de lait Avortements Infertilité temporaire chez les taureaux	Hyperthermie >40 °C Signes nerveux : tremblements, vaciller Syndrome de détresse respiratoire Perte d'appétit Faiblesse Refus de déplacement Hémoglobinurie en phase clinique avancée Atrophie musculaire en décubitus	Hyperthermie moins caractéristique Pas d'implication cérébrale Anémie Ictère Œdème pulmonaire Hémoglobinurie est plus constante Mort subite dans les cas sévères	Hyperthermie >40 °C Anémie Anorexie Hypertrophie des ganglions lymphatiques Perte de poids Faible production de lait Signes nerveux Avortements Mort subite

## 6.4 Diagnostic

Chez les bovins, pour le diagnostic des agents hémopathogènes tels que *A. marginale*, *Babesia* spp, et *Trypanosoma* spp, on utilise soit des techniques permettant la détection des micro-organismes, soit la détection de leur ADN, soit des techniques sérologiques (Aubry & Geale, 2011; Bock et al., 2004; Desquesnes et al., 2022).

### 6.4.1 Techniques parasitologiques

#### Microscopie des frottis sanguins

L'une des techniques les plus utilisées pour détecter les agents hémotropes ciblés dans ce travail est le frottis sanguin, notamment pour la confirmation des cas cliniques (OMSA, 2023). De plus, un diagnostic différentiel peut être établi pour les comparer et cette technique est rapide et peu coûteuse (Desquesnes et al., 2022). Les techniques de détection des microorganismes peuvent perdre en sensibilité lorsque leur taux sanguin est très faible (Desquesnes et al., 2022; Eshetu, 2015).

Dans le cas de *A. marginale* et *B. bigemina*, les frottis doivent être réalisés avec des échantillons de sang prélevés à la jugulaire ou à un autre gros vaisseau sanguin, cependant pour *B. bovis* les frottis doivent être réalisés avec du sang capillaire pouvant provenir de l'oreille ou le bout de la queue car ces protozoaires sont séquestrés et se retrouvent en plus grande quantité dans le sang capillaire (OMSA, 2023). Chez *A. marginale*, cette technique n'est pas fiable dans deux cas de figure : i) les cas avancés de la maladie, car les animaux souffrent d'anémie sévère et les inclusions intra-érythrocytaires ne sont pas facilement mises en évidence, chez les bovins infectés de manière persistante après une infection aiguë (Kocan et al., 2010).

Pour réaliser cette technique, on peut utiliser du sang prélevé dans un tube contenant un anticoagulant, et la coloration peut être réalisée avec du Giemsa à 10% (eau maintenue à un pH de 7.2 à 7.4), préalablement le frottis est fixé au méthanol absolu pendant 1 minute puis il faut procéder à la coloration pendant 30 minutes et laver à l'eau pour éliminer l'excès de colorant, en laissant sécher à l'air libre (OMSA, 2023).

*A. marginale* apparaît au microscope à grossissement 100X sous la forme de corps intra-érythrocytaires arrondis et colorés, d'environ 0.3 à 1.0  $\mu$  de diamètre ; les corpuscules sont situés en marge de l'érythrocyte ou à proximité de celle-ci (Figure 8) (OMSA, 2023).

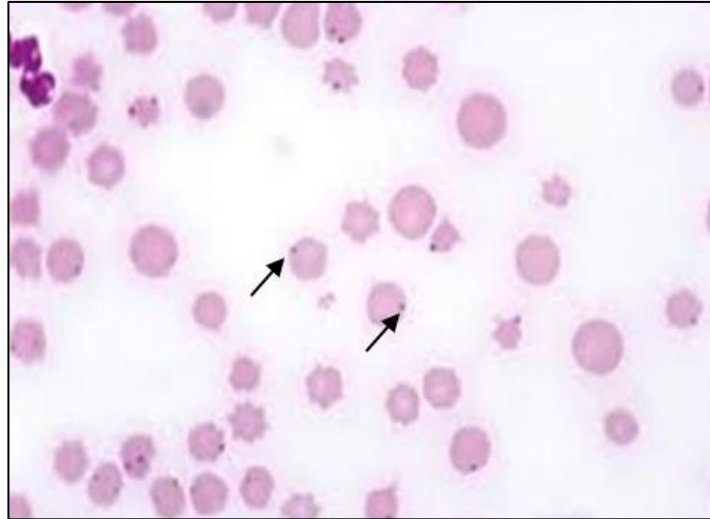


Figure 8. *Anaplasma marginale*

Source: (Atif, 2016) Légende : grossissement 100 X

L'observation de *Babesia* spp. est réalisée à 100X à l'aide d'une goutte d'huile d'immersion. Dans le cas de *B. bigemina*, les mérozoïtes mesurent 2,5 et 3,5  $\mu\text{m}$  de diamètre et chez *B. bovis* ils mesurent 1,5 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 9) (Mosqueda et al., 2012).

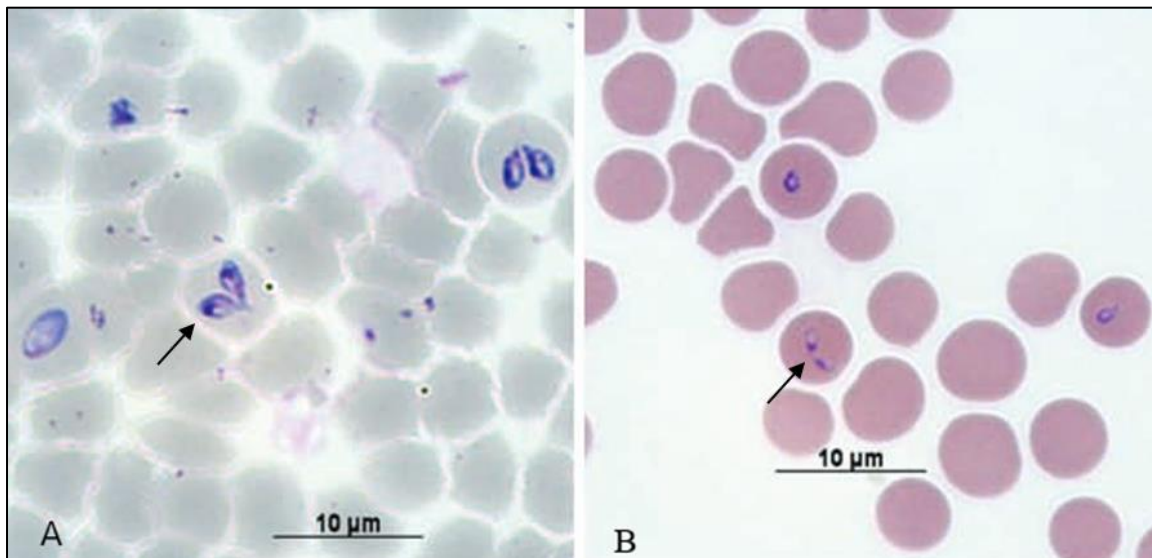


Figure 9. *Babesia bigemina* (A) et *Babesia bovis* (B)

Source: ( Mosqueda et al., 2012) Légende : grossissement 100 X

Au microscope, *T. vivax* mesure entre 16 et 26  $\mu\text{m}$ , possède un flagelle libre de 7  $\mu\text{m}$ , une membrane ondulante atrophiée, un gros kinétoplaste (1  $\mu\text{m}$ ) en position terminale et la partie postérieure est arrondie. *Trypanosoma evansi* mesure de 15 à 34  $\mu\text{m}$ , est de forme élancée, possède un flagelle libre (3 à 5  $\mu\text{m}$ ), la membrane ondulante est très développée, possède un grand kinétoplaste qui peut être situé loin de

l'extrémité postérieure effilée du parasite ou peut être absent. *Trypanosoma theileri* mesure entre 69 et 109  $\mu$ , possède un flagelle libre de 4 à 26  $\mu$ , une membrane ondulante bien développée, un grand kinétoplaste et est situé dans la partie postérieure effilée (Figure 10) (Desquesnes, 2004).



Figure 10. *Trypanosoma vivax* (A), *Trypanosoma evansi* (B) et *Trypanosoma theileri* (C)

Source: (Desquesnes, 2004; Rosyadi et al., 2021) Légende : grossissement 100 X

#### **Technique de centrifugation de l'hématocrite (HCT, Woo)**

La technique Woo est une méthode parasitologique pour le diagnostic de *Trypanosoma* spp. C'est une méthode largement utilisée, principalement pour la confirmation des cas cliniques et pour démontrer l'absence du parasite dans une population. Pour la détection du parasite, par exemple dans le cas de *T. vivax*, la sensibilité de cette méthode peut atteindre 100% tant que la parasitémie est supérieure à 700 trypanosomes/ml de sang (OIE, 2018).

Il s'agit d'une technique facile à réaliser et peu coûteuse, mais il est difficile de différencier les espèces de *Trypanosoma* spp. qui peuvent affecter les bovins, bien que l'on puisse prendre en compte la motilité du parasite : *T. vivax* est beaucoup plus mobile que *T. theileri* qui présentera plutôt des mouvements fluides (Desquesnes, 2004; Desquesnes et al., 2022).

Cette technique consiste à prélever du sang frais (environ 70  $\mu$ l) dans des tubes capillaires héparinés ; une extrémité du tube est bouchée avec de la pâte à modeler puis le tube est centrifugé dans une centrifugeuse pour micro-HCT à 9000 g pendant 5 minutes. On examine ensuite au microscope l'interface entre le plasma et la couche leucocytaire, par mouvements de rotation du tube. Les mouvements des trypanosomes seront observés à l'aide d'une lentille à grossissement 40X, à ouverture réduite du condenseur (OIE, 2018).

### 6.4.2 Techniques moléculaires

Les techniques moléculaires sont actuellement utilisées pour le diagnostic des hémoparasites chez les bovins, ainsi que les techniques parasitologiques et sérologiques en raison de leur grande sensibilité et spécificité. Cependant, en raison de leur coût élevé, leur utilisation reste encore limitée pour le diagnostic animal. Ces tests peuvent également présenter des faux négatifs lorsque les parasitémies sont faibles, ce qui peut être le cas lors d'infection chronique et chez des porteurs sains (Fernández et al., 2009). D'autres facteurs pouvant influencer l'amplification de l'ADN dans la technique PCR sont la présence de contaminants dans l'échantillon ou dans les réactifs tels que les inhibiteurs de la Taq polymérase (Desquesnes & Dávila, 2002; Da Silva et al., 2022), la préparation de l'échantillon et la méthode d'extraction de l'ADN utilisée (Gonzales et al., 2006). En revanche, la sensibilité de la PCR varie en fonction des amorces utilisées qui sont déterminées par le nombre de copies et l'homologie des amorces avec la séquence cible.

Pour la détection de *Trypanosoma* spp. par PCR, plusieurs paires d'amorces ont été conçues pour l'identification des agents à la fois chez l'animal hôte et dans le vecteur. La sensibilité de la PCR pour la détection de *Trypanosoma* spp est généralement comprise entre 1 et 20 parasites/mL de sang (0,001 à 0,02 parasites/ $\mu$ L) selon la technique utilisée (Desquesnes & Dávila, 2002). Pour l'amplification de l'ADN de *T. vivax*, il existe des amorces TVW qui se sont révélées très sensibles, même si en Afrique de l'Est, leur utilisation ne permet pas de détecter certaines souches de *T. vivax* (Desquesnes et al., 2022). Cependant, en Amérique du Sud, la PCR a été utilisée avec ce jeu d'amorces TVW ; la sensibilité dans les échantillons de phase aiguë et chronique était de 98.66 %, ce qui est efficace pour les analyses sur le terrain (Gonzales et al., 2006).

Un autre ensemble d'amorces, à savoir les OIT 1264 et OIT 1265, induit un produit de PCR d'environ 400 pb lorsqu'elles sont utilisées dans l'amplification de l'ADN de *T. vivax*. Ces amorces ont engendré une sensibilité de 92 % lors de l'utilisation d'échantillons de sang d'animaux inoculés expérimentalement avec *T. vivax* (Gonzales et al., 2006). Les amorces ILO1264/1265 ont une sensibilité similaire aux amorces TVWA/B, malgré un nombre de copies inférieur dans le génome du parasite (40 copies), et sont utilisées pour détecter l'ADN d'une grande variété d'isolats provenant de régions telles que l'Amérique du Sud et l'Afrique (Masake et al., 1997; Eleizalde et al., 2021).

Un autre marqueur très sensible est l'espaceur inter-ribosomal ITS, utilisé pour établir des relations et différencier les espèces dans un large éventail d'organismes (Cox et al., 2005). Il amplifie des fragments de plusieurs espèces comme *T. vivax* (307 pb) et *T. evansi* (540 pb). Cet espaceur permet de discriminer les infections ou co-infections entre ces espèces (Magez & Radwanska, 2014). L'espaceur ITS1 a été le premier marqueur utilisé pour l'identification moléculaire de *T. theileri*, un amplicon d'environ 900 pb ayant été présenté. Pour cette PCR, deux paires d'amorces ont été utilisées, plus

précisément ITS1, ITS2, ITS3, ITS 4, cet espaceur peut également être utilisé pour l'analyse phylogénétique. L'espaceur ITS1 a généré une sensibilité inférieure à celle d'autres amorces utilisées spécifiquement pour la détection de *T. evansi* et *T. vivax*. Néanmoins, il peut être utilisé pour la détection de doubles infections en une seule réaction, ce qui permet d'économiser du temps et de réduire les coûts (Ramírez-Iglesias et al., 2017).

Le gène CatL (cystéine protéases de type Cathepsin L) dans les trypanosomes joue un rôle dans le métabolisme, l'infection, la différenciation cellulaire, l'immunité et la pathogenèse dans le cycle de vie des hôtes et des vecteurs, le marqueur TviCatL a été utilisé pour déterminer la diversité génétique et comparer les isolats africains et sud-américains de *T. vivax* (Cortez et al., 2009). La PCR du gène CatL permet de détecter l'ADN de *T. vivax* lors de faible parasitémie chez l'animal ou chez les animaux en phase chronique de la maladie (Alcindo et al., 2022).

Pour l'identification de *T. evansi*, plusieurs amorces spécifiques ont été recommandées dont les amorces ESAG6/7F. Elles ne produisent pas de réactions croisées avec d'autres trypanosomes tels que *T. theileri* (Holland et al., 2001). La sensibilité des amorces ESAG 6/7F et TBR1/2 a été évaluée lors d'infections expérimentales chez des souris: la quantité minimale d'ADN détectée par PCR avec ces amorces était de 0,001 ng. De plus, cette PCR a pu détecter les animaux infectés 12 heures après l'infection (Fernández et al., 2009). D'autre part, une corrélation entre la diversité génétique des gènes ESAG 6 qui codent pour le récepteur de liaison à la transferrine et la large gamme d'hôtes de *T. evansi* a été mise en évidence (Witola et al., 2005).

Pour la détection d'*A. marginale*, plusieurs techniques de PCR ont été développées, dont certaines ont présenté une sensibilité analytique de 0,0001 % des érythrocytes infectés ; à ce niveau, seule une proportion de bovins porteurs serait détectée (OMSA, 2023). L'une des amorces les plus utilisées est celle qui code pour les gènes *msp*, qui sont liés aux interactions entre la bactérie et l'hôte (in)vertébré. Certains auteurs ont suggéré que ces gènes étaient très utiles pour comparer des souches dans certaines régions mais pas à l'échelle mondiale (Kocan et al., 2010). Les gènes *msp5* sont conservés chez toutes les Rickettsiales et sont très stables parmi les *Anaplasma* spp. bien que leur fonction soit inconnue (Battilani et al., 2017). La protéine MSP5 peut être utilisée comme antigène pour le développement de techniques de diagnostic telles que l'ELISA compétitif disponible dans le commerce aux États-Unis pour détecter l'infection par *A. marginale* (Reyna-Bello, 2014; Battilani et al., 2017).

La PCR est une technique largement utilisée pour le diagnostic, les études épidémiologiques et l'identification des espèces de *Babesia* spp. en raison de sa grande sensibilité par rapport au frottis sanguin. On estime que la PCR permet de détecter des charges parasitaires avec des niveaux de parasitémie compris entre 0,001% et 0,0000001% (OMSA, 2023). Cependant, la PCR sanguine peut

être négative après traitement ou chez les animaux infectés de manière chronique (Beugnet & Moreau, 2015).

Des biomarqueurs tel le gène de l'ARNr 18S ont été conçus pour la détection et l'identification par PCR de ce protozoaire chez les espèces eucaryotes. Ce marqueur est utilisé pour le diagnostic, les études épidémiologiques et phylogénétiques de la babésiose bovine, et peut discriminer différentes espèces en raison de sa spécificité élevée et de la conservation de sa séquence (Figueroa et al., 1992; Wang et al., 2019). Il permet la différenciation d'espèces étroitement apparentées chez les piroplasmides des bovins et chez les espèces sauvages telles que les cervidés (Hrazdilová et al., 2020). Les amorces PIRO A et B, couramment utilisées pour la détection et l'identification des espèces de *Babesia* spp. hautement conservées dans ce genre, permettent une détection à large spectre de ce gène (Martínez-García et al., 2021).

Le gène RAP-1 est une séquence bien conservée chez *B. bovis*, il est donc utile d'amplifier l'ADN de cette espèce. Il peut être détecté chez plusieurs espèces et même dans le vecteur (Martínez-García et al., 2021). Différentes techniques de PCR ont été développées pour l'identification du gène hyp (protéine hypothétique) de *B. bigemina* à l'aide d'amorces BilA/BilB avec un niveau de détection de 0.0000001% (moins d'un érythrocyte infecté) (Figueroa et al., 1992). Cependant, dans certains cas, ces amorces doivent être combinées avec d'autres pour augmenter la spécificité. De plus, il a été rapporté qu'elles nécessitent des conditions de température spécifiques pour l'amplification (Martins et al., 2008).

Le développement de techniques de PCR multiplexée pourrait être une alternative pour le diagnostic de plusieurs de ces micro-organismes, permettant d'économiser du temps et des coûts de laboratoire. L'utilisation de la PCR multiplexée à l'aide d'amorces ITS a permis de détecter des infections mixtes de *T. vivax* et de *T. evansi* chez les bovins (Ramírez-Iglesias et al., 2017). Une étude réalisée en Inde a utilisé une PCR multiplexée pour identifier *B. bigemina*, *T. annulata*, *A. marginale* et *T. evansi* avec des résultats cohérents dans des conditions de terrain (Ganguly et al., 2020). Une autre étude a mis au point un essai d'hybridation par transfert de ligne inverse (*Reverse Line Blot Hybridization Assay*, RLB) pour la détection et l'identification simultanées d'*Anaplasma* spp., de *Babesia* spp. et de *Trypanosoma* spp. chez les bovins (Paoletta et al., 2018). Cependant, elles peuvent encore présenter des inconvénients par rapport à la PCR uniplexée, tels que le nombre élevé de réactifs pour réaliser l'analyse, une méthode de normalisation lourde, la quantité d'ADN, ainsi que la concurrence entre les amorces. Leur utilisation est donc limitée. Le Tableau 4 résume les amorces utilisées pour l'analyse moléculaire des agents hémotropes.

**Tableau 4. Liste des amorces utilisées pour la détection moléculaire par PCR des agents hémotropes chez les bovins**

Agent hémotropes	Gène ciblé	Amorce	Séquence oligonucléotidique (5' -3')	Référence
<i>T. theileri</i>	<i>CATL</i>	TthCATL1	CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC	(Rodrigues et al., 2010)
		DT0155	TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA	(Cortez et al., 2009)
	<i>ITS</i>	ITS1	GATTACGTCCCTGCCATTTG	(Cox et al., 2005)
		ITS2	TTGTTCGCTATCGGTCTTCC	
		ITS3	GGAAGCAAAAGTCGTAACAAGG	
ITS4	TGTTTTCTTTTCCTCCGCTG			
<i>T. vivax</i>	<i>CATL</i>	TviCatL1	GCCATCGCCAAGTACCTCGCCGA	(Cortez et al., 2009)
		DT0155	TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA	
	<i>ILO</i>	ILO 1264	CAGCTCGGCGAAGGCCACTTGGCTGGG	(Masake et al., 1997)
		ILO 1265	TCGCTACCACAGTCGCAATCGTCGTCTCAAGG	(Eleizalde et al., 2021)
<i>T. evansi</i>	<i>ESAG</i>	ESAG6/7F	ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG	(Holland et al., 2001)
		ESAG6/7R	CACGTGAATCCTCAATTTTGT	
<i>A. marginale</i>	<i>msp5</i>	19A	GTGTTCCCTGGGGTACTCCTA	(Tana-Hernández et al., 2017)
		19B	TGATCTGGTCAGCCCCAGCT	
<i>B. bovis</i>	<i>RAP-1</i>	BoF	CACGAGGAAGGAACACTACCGATGTTGA	(Figueroa et al., 1993)
		BoR	CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA	
<i>B. bigemina</i>	<i>HYP</i>	BiIA	CATCTAATTTCTCTCCATACCCCTCC	(Figueroa et al., 1992)
		BiIB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAG	
<i>Babesia spp</i>	<i>18S</i>	PIRO A	AATACCCAATCCTGACACACAGGG	(Olmeda et al., 1997)
		PIRO B	TTAAATACACGAATGCCCCCCAAC	

### 6.4.3 Diagnostic sérologique

Les tests sérologiques tels que le test ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) sont recommandés pour la détection des anticorps contre les agents hémotropes, pour démontrer l'absence d'infection dans une population, pour démontrer l'absence d'infection individuelle avant un déplacement et pour des études de prévalence dans la population (OIE, 2018).

Dans le cas de l'anaplasmose, des techniques ELISA ont été mises au point et sont disponibles dans le commerce. Un ELISA compétitif qui utilise un anticorps monoclonal pour la détection de la protéine MSP5 a été mis au point ; il peut détecter les infections par *A. marginale* avec une grande sensibilité, mais peut donner lieu à des réactions croisées avec d'autres espèces telles que *A. phagocytophilum* (Kocan et al., 2010). La protéine MSP5 a été utilisée comme antigène pour le développement d'un test ELISA indirect utilisé lors d'études de prévalence chez différentes espèces telles que les bovins, les ovins et les caprins (Reyna-Bello, 2014).

Pour le diagnostic sérologique de *Babesia* spp., on utilise l'IFAT (*Indirect Fluorescent Antibody Test*), technique très sensible si l'on utilise des antigènes tels que : glycoprotéines de surface de *Babesia*, mais c'est difficile d'en obtenir. C'est une technique qui peut donner lieu à des réactions croisées et qui nécessite également un personnel expérimenté et un équipement coûteux. Le développement de la biotechnologie a permis l'utilisation de protéines recombinantes et d'anticorps monoclonaux, ce qui a conduit au développement de plusieurs versions d'ELISA à haute sensibilité et spécificité pour la détection de *Babesia* spp. telles que *B. bovis* et *B. bigemina* (Mosqueda et al., 2012).

La technique ELISA est largement utilisée pour le diagnostic des *Trypanosoma* spp. chez les bovins, mais la purification des protéines en tant qu'antigènes a été limitée aux laboratoires de recherche avec les inconvénients de standardisation, du temps nécessaire à sa mise en œuvre et de la disponibilité des sérums de référence. Ces facteurs peuvent représenter un inconvénient lors de l'interprétation des résultats, mais cette technique reste un outil pour les enquêtes à grande échelle ainsi que pour le suivi après des campagnes de traitement (Desquesnes et al., 2022). La technique ELISA peut présenter des réactions croisées avec d'autres parasites du même genre, en particulier dans les zones endémiques où les infections à *T. evansi* sont fréquentes (Osório et al., 2008).

Une autre technique disponible dans le commerce pour le diagnostic de *Trypanosoma* spp. est la technique d'agglutination CATT développée avec un antigène de *T. evansi*. Elle détecte les IgM et IgG et peut donc détecter les infections récentes, chroniques et guéries. Le CATT est conçu pour des infections à *T. evansi* et donc la sensibilité pour des infections *T. vivax* est limitée. Cette technique est très sensible chez les équidés, les buffles, les chameaux, les moutons, les chèvres et les chiens. (Desquesnes et al., 2022).

#### 6.4.4 Traitement

Le traitement antimicrobien de l'anaplasmose bovine comprend l'utilisation de médicaments tels que la tétracycline et le dipropionate d'imidocarb. Ces médicaments visent à contrôler l'infection chez des animaux apparemment sains pendant la saison des vecteurs, prévenant ainsi l'apparition de symptômes cliniques, en plus de traiter les animaux déjà malades (Aubry & Geale, 2010).

Les tétracyclines, lorsqu'elles sont administrées aux doses thérapeutiques recommandées, sont efficaces pour réduire le niveau de parasitémie et atténuer les effets cliniques de la maladie, bien qu'elles n'éliminent pas de manière fiable le micro-organisme chez les animaux infectés de manière persistante (Suarez & Noh, 2011). L'une des tétracyclines les plus utilisées est l'oxytétracycline, qui est un bactériostatique qui agit en se liant aux ribosomes et à l'ARNm, provoquant l'inhibition de la synthèse des protéines. La dose recommandée d'oxytétracycline pour le traitement de l'anaplasmose clinique bovine est généralement de : 10 à 20 mg/kg poids corporel, administrée par voie intramusculaire ou par voie intraveineuse lente, plusieurs doses peuvent être appliquées à des intervalles de 3 à 7 jours, selon la gravité de l'infection et la réponse de l'animal (Kocan, 2010).

En revanche, le dipropionate d'imidocarb peut être utilisé pour le traitement de l'anaplasmose aiguë, à raison d'une dose unique de 2,1 mg/kg ou de deux doses de 5 mg/kg à 14 jours d'intervalle, par injection sous-cutanée ou intramusculaire. Cependant, ce médicament présente plusieurs inconvénients dont il faut tenir compte avant son utilisation : à forte dose, il peut être toxique pour l'animal, il présente un long temps d'attente pour la viande et le lait, et bien qu'il puisse réduire les niveaux de bactériémie, il n'assure pas l'élimination totale des infections persistantes (Kocan, 2010).

Puisqu'il n'existe aucune méthode fiable pour éliminer les infections persistantes à *A. marginale* chez le bétail, il est nécessaire de restreindre les déplacements des animaux en provenance des zones d'endémie par mesure de précaution afin de protéger les troupeaux dans les régions où la maladie n'est pas endémique (Kocan, 2010).

Dans le cas de la babésiose bovine, le médicament couramment utilisé est le dipropionate d'imidocarb, qui est efficace à la fois dans le traitement et dans la prévention à court terme de la maladie. Le mode d'action de l'imidocarb n'est pas complètement compris, mais il semble interférer dans l'entrée d'inositol dans les érythrocytes parasités, provoquant la famine du protozoaire, la dose recommandée est de 1 à 3 mg/kg par voie intramusculaire ou intraveineuse (Bock, 2008).

Un autre médicament utilisé pour le traitement de la babésiose est l'acéturate de diminazène, qui est également largement utilisé dans la gestion de la trypanosomiase bovine. Le diminazène se lie de manière irréversible à l'ADN double brin du kinétoplaste (ADNk), interférant avec sa réplication et sa

fonction. Pour le traitement de la babésiose bovine, la dose recommandée est de 3 à 5 mg/kg par voie intramusculaire (Mosqueda et al., 2012). Il est essentiel de ne pas dépasser la dose indiquée pour éviter la toxicité et, si nécessaire, elle peut être répétée après 48 à 72 heures, en fonction de la réponse clinique de l'animal et de l'évaluation vétérinaire (Mosqueda et al., 2012).

Des problèmes de résistance ont été démontrés tant au dipropionate d'imidocarbe qu'à l'acéturate de diminazène, en plus du fait que ces médicaments sont associés à la présence de résidus à long terme dans les produits de la chaîne alimentaire, comme le lait et la viande (Suarez et al., 2011). Les tétracyclines peuvent être utilisées comme traitement d'appoint ou préventif pour les infections mixtes de babésiose et d'anaplasiose.

Concernant le traitement des trypanosomoses, l'un des médicaments les plus utilisés est l'acéturate de diminazène en raison de son activité contre *T. congolense* et *T. vivax*, la dose recommandée est de 3,5 mg/kg de poids et une dose de 7 mg/kg indiquée pour *T. brucei* spp. et pour la « surra » administré par injection intramusculaire ou sous-cutanée. L'acéturate de diminazène est utilisé uniquement comme agent thérapeutique et non comme agent prophylactique, car il est rapidement métabolisé et excrété (Giordani et al., 2016).

Un autre médicament utilisé est le chlorure d'isométymidium, dont le mécanisme d'action consiste à se lier aux acides nucléiques du parasite, en particulier à son ADN, ce qui interfère avec la réplication et la synthèse de l'ADN du parasite. Cela empêche le parasite de se reproduire et de se multiplier au sein de l'hôte (Magez & Radwanska 2014). Il est efficace à la fois dans le traitement et dans la prévention de la trypanosomose causée par *T. congolense* et *T. vivax* chez le bétail en Afrique. Il est principalement administré par voie intramusculaire. Son activité contre *T. brucei* spp. est moins prononcée, bien qu'elle puisse être efficace contre certaines souches de *T. b. evansi*, tant que l'infection n'a pas atteint le système nerveux central, puisque le composé ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique. La dose unique recommandée pour le bétail est de 0,25 à 1,0 mg/kg pour le traitement et de 0,5 à 1 mg/kg pour la prophylaxie. Pour *T. b. evansi*, la dose est généralement de 1 à 2 mg/kg, mais chez les chevaux, il est suggéré de ne pas dépasser 0,5 mg/kg en raison de problèmes de toxicité (Giordani et al., 2016).

Des cas de résistance à l'acéturate de diminazène et au chlorure d'isométymidium ont été signalés dans des régions d'Afrique et d'Amérique du Sud (Ungogo & de Koning, 2024). D'autres médicaments utilisés pour le traitement de la trypanosomose sont la suramine, utilisée dans certains cas, notamment dans les infections chroniques ou résistantes, et l'homidium (bromure ou chlorure), mais son utilisation doit être prudente pour éviter toute toxicité.

---

# **Chapitre 2**

## **Objectifs**

---

## Objectif général

Contribution à la lutte contre les agents hémotropes chez les bovins en Équateur, par l'identification et l'isolement des agents responsables (*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp et *Trypanosoma* spp) et l'élaboration de protocoles de gestion des foyers

## Objectifs spécifiques

Bien que l'anaplasmose et la babésiose soient présentes chez les bovins en Équateur, très peu d'études se sont concentrées sur l'identification des agents responsables à l'aide de techniques moléculaires. Par contre, la trypanosomose est une maladie inconnue dans le pays. Le premier objectif spécifique était donc : **Identifier moléculairement et déterminer la prévalence de *Trypanosoma* spp et d'autres agent hémotropes (*A. marginale*, *Babesia* spp) chez les bovins dans les provinces de Santo Domingo de los Tsachilas, Manabi, Pichincha et Galápagos.**

Le deuxième objectif spécifique était: **Caractériser les espèces de trypanosomes impliquées dans le foyer de trypanosomose bovine signalé dans la province de Manabí, à l'aide de méthodes moléculaires.**

Afin de rechercher les espèces de différents agent hémotropes qui affectent les bovins, l'une des stratégies consistait à visiter deux abattoirs de bétail dans deux régions du pays. Etant donné que ces abattoirs reçoivent des animaux provenant de différentes provinces de l'Équateur, le troisième objectif spécifique était donc le suivant : **Identifier moléculairement *T. theileri* chez les bovins provenant de deux abattoirs : Pichincha et Santo Domingo de los Tsáchilas et sa relation avec d'autres agents hémotropes.**

Et le quatrième objectif spécifique était : **Identifier moléculairement de *Trypanosoma vivax* chez des vecteurs hématophages potentiels de trois régions de la partie continentale de l'Équateur.**

---

# **Chapitre 3**

## **Section expérimentale**

---

# Section expérimentale

## **Etude 1 :**

**PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments**

*BMC Veterinary Research (2017) 13:392*

Leandro Tana-Hernández, Katherine Navarrete-Arroyo, Jorge Ron-Román, Armando Reyna-Bello and María Augusta Chávez-Larrea.

## *Préambule*

Bien que le travail de cette thèse se concentre sur l'étude de la trypanosmose bovine, l'étude a également été complétée par d'autres agents hémotropes du sang bovin, tels que l'anaplasmose et la babésiose bovine. Dans ce contexte, des études récentes ont montré que l'anaplasmose bovine est une maladie très répandue, avec une prévalence de 68 % et 93 % en Amazonie et aux Galapagos respectivement (Muñoz et al., 2020 ; Gioia et al., 2017). Le travail réalisé par Tana et al en 2017, constitue le premier rapport moléculaire d'*Anaplasma marginale* en Équateur grâce à l'utilisation de l'amplification du gène *msp5*. Ce travail a été inclus dans la thèse, car il a démontré l'importance de caractériser l'agent causal afin de clarifier la situation épidémiologique de la maladie et, à partir de cette découverte, la technique PCR a été mise en œuvre dans les laboratoires de biotechnologie animale de l'ESPE, en tant que test de diagnostic de la maladie.

*Anaplasma marginale* est une rickettsie qui affecte les bovins et qui est largement répandue dans les zones tropicales et subtropicales. En Équateur, l'anaplasmose est présente dans les zones tropicales et subtropicales des quatre régions naturelles (Côte, Sierra, Amazonie et Galápagos). Dans la présente étude, une zone de la région côtière équatorienne de la province de Santo Domingo de los Tsachilas a été visitée. Au total, 15 fermes laitières ont été échantillonnées en décembre 2014 et 151 échantillons de sang bovin ont été collectés.

L'objectif de l'étude était la standardisation d'une PCR basée sur la détection d'un fragment d'ADN de 605 pb du gène codant pour la protéine de surface MSP5 dans des échantillons de sang de bovins. MSP5 est une protéine immuno-dominante codée par un seul gène, conservée chez toutes les Rickettsiales et très stable parmi les *Anaplasma* spp. Sa fonction est inconnue. Dans cette étude, *A. marginale* a été caractérisé pour la première fois chez des bovins en Équateur, grâce à l'analyse de deux échantillons prélevés au hasard et en utilisant un séquençage d'ADNr 16S préalablement cloné. Une similarité de 100% a été identifiée avec la souche St Maries de *A. marginale* par Brayton et al., 2005

Tana-Hernández et al. *BMC Veterinary Research* (2017) 13:392  
 DOI 10.1186/s12917-017-1311-1

BMC Veterinary Research

RESEARCH ARTICLE

Open Access



# PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments

Leandro Tana-Hernández<sup>1</sup>, Katherine Navarrete-Arroyo<sup>1</sup>, Jorge Ron-Román<sup>2</sup>, Armando Reyna-Bello<sup>1,3</sup> and María Augusta Chávez-Larrea<sup>1,4\*</sup>

## Abstract

**Background:** Bovine anaplasmosis is an endemic disease in tropical and subtropical areas. It is caused by a bacterium named *Anaplasma marginale*, and represents an economic problem for cattle farmers due to the losses it generates, such as: mortalities, reduced production, quarantine measures, treatments and control of vectors. The method most often used to diagnose this haemotrophic bacterium is direct examination on blood smear, which sensitivity and specificity are limited compared to other methods such as PCR. The present study aimed at investigating the presence of *A. marginale* in dairy cattle of Luz de América commune, province of Santo Domingo de los Tsachilas. Two PCRs were used to amplify specific regions of the *Rickettsia* for its molecular identification.

**Results:** At first, 151 blood samples were tested: *msp5* specific gene of *A. marginale* was identified in 130 samples, meaning 86.1% of them were infected by the rickettsia. Two positive samples were further randomly selected to confirm the presence of *A. marginale* through amplification, cloning and sequencing of the conserved region of gene 16S rRNA. The analysis of sequences obtained through cloning revealed a 100% identity between both samples and those registered in GenBank for *A. marginale*.

**Conclusion:** This is the first report and molecular identification of *A. marginale* in the bovine population of Ecuador and its prevalence was high at the level of farms and animals. These results demonstrate the importance of proceeding to evaluate and characterize bovine Anaplasmosis in Ecuador in order to establish control measures and reduce their impact.

**Keywords:** Bovine Anaplasmosis, *Anaplasma marginale*, *msp5*, 16S rRNA, Bovine disease, Ecuador

## Background

Bovine anaplasmosis is a vector-borne disease caused by the rickettsia *Anaplasma marginale* (*A. marginale*). The disease is mainly characterized by fever, anaemia, weight loss, pale mucous membranes and sometimes death of affected animals. Its distribution includes the whole

American continent, Asia, Africa, Europa and Australia, and generates reduced production, increased costs and hinders genetic improvement through the difficulty of introducing susceptible animals in endemic herds [1–3].

The distribution of the bacteria depends on the presence/absence of vectors, which are arthropods belonging to the Family Ixodidae; the most important are genera *Dermacentor* and *Rhipicephalus*. In Latin America, the tick of major distribution is *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*), which is incriminated as vector of anaplasmosis [4]. However, the epidemiological importance of ticks in the eco-epidemiology of the disease in Latin America is controversial, as the transmission of the

\* Correspondence: machavez@espe.edu.ec

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador

<sup>4</sup>Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Av. General Rumiñahui s/n, P.O.BOX: 171-5-231, Sangolquí, Ecuador

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

rickettsia by blood sucking insects, such as horseflies, would be more important [4, 5].

Most animals positive for anaplasmosis are permanently infected, with a rickettsemia ranging from  $10^4$  to  $10^7$  [6]. They are responsible for an epidemiological status known as 'enzootic stability' in herds [4]. As the majority of animals in this condition have a low rickettsemia and do not show clinical signs, diagnosis is difficult [1, 6, 7].

Serological and molecular diagnoses are the only methods allowing the detection of *A. marginale*, as their sensitivity and specificity are high [8]. Polymerase Chain Reaction (PCR), based on amplification of DNA fragment, has been recommended to detect infection in animals to be commercialized and/or moved internationally [9]. A positive result to the Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) only confirms the presence of the pathogen at some time, as it detects antibodies; it does not necessarily mean the pathogen is present by the time the test is performed [8]. Culture and isolation of the causing agent are frequently used as gold standard methods for diagnosing other bacterial diseases; they are not applicable in the case of *A. marginale* as it cannot be cultured [10]. The unique gold standard remains xenodiagnosis which is not very convenient [8, 9]. For such reason, PCR recommended as confirmatory test for the diagnosis of bovine anaplasmosis [11]. In addition to PCR, the sequencing of 16S of ribosomal RNA (16S rRNA) gene allows identifying genus and species of these microorganisms; it has thus been used concomitantly with groESL operon for further classification [10].

Despite the tropical distribution of bovine anaplasmosis, little has been done to confirm the presence of the disease in Ecuadorian cattle, even though horseflies and *R. microplus* ticks are present in Ecuador [12, 13]. However, neither spatiotemporal distribution, risk factors associated with the disease nor characterization of the causing agent has been studied deeply in the country. The scarce scientific information available is mainly found in theses performed in universities and in non-indexed journals. For example a 68%-prevalence was recently reported by Muñoz and collaborators after using blood smear [14]. On the other hand, a prevalence of 85.5% was estimated by nested PCR in cattle sampled in the province of Los Rios, Quevedo canton [15], while Soto reported a prevalence of 91.7% by using a commercial ELISA [16].

The rickettsia was even identified through sequencing of 16S rRNA gene in *R. microplus* ticks collected on two cows [13]. In view of these preliminary results, one could think the disease is endemic in cattle of Ecuador. In order to collect a better information on the presence of bovine anaplasmosis, a PCR based on the detection of the DNA fragment 605 bp of Mayor Surface Protein 5

(*msp5*) [17] was standardized and tested in animals located in an area where vectors are present. Subsequently, a sequencing of previously cloned 16S rRNA obtained from two samples collected at random was performed for confirmation.

## Methods

### Type of study and geographic localization

In December 2014, a transversal study including two levels of sampling (herd and animal) was carried out. Blood samples were collected from cattle ( $n = 151$ ) belonging to 15 dairy herds gathered in province of Santo Domingo de los Tsáchilas, humid tropical region at an altitude of 655 m above sea level [18] (Figs. 1 and 2).

### Collection of blood samples

Blood samples were collected at random, in 4 cm<sup>3</sup>-tubes with EDTA, through coccygeal vein puncture with 0.75 mm × 25 mm Vacutainer® needles. Samples were then stored at -20 °C until further use and analysis.

### DNA extraction

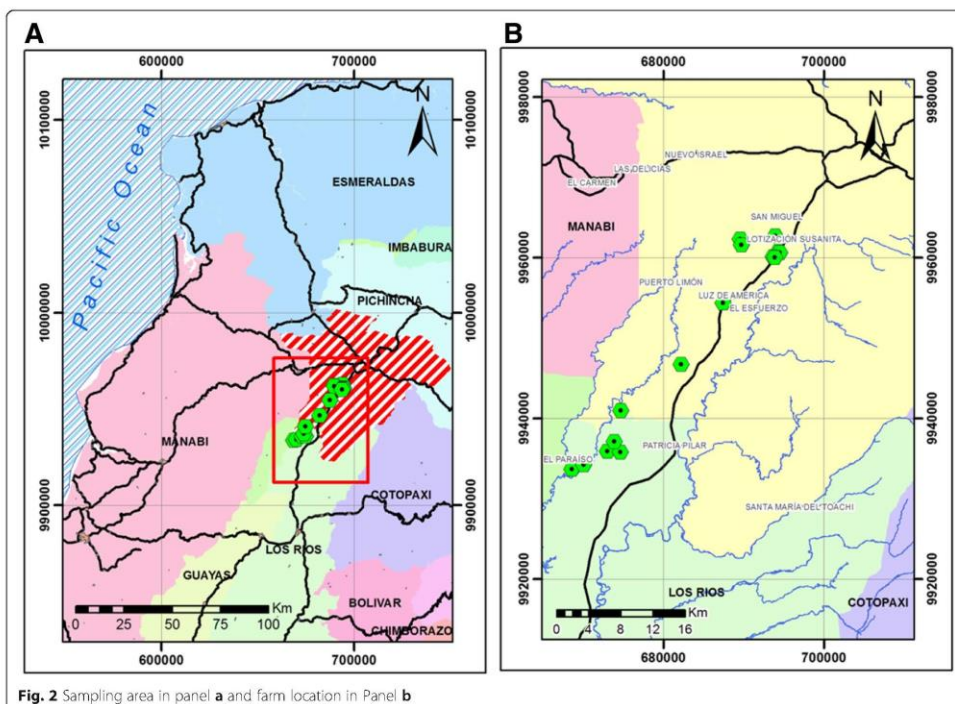
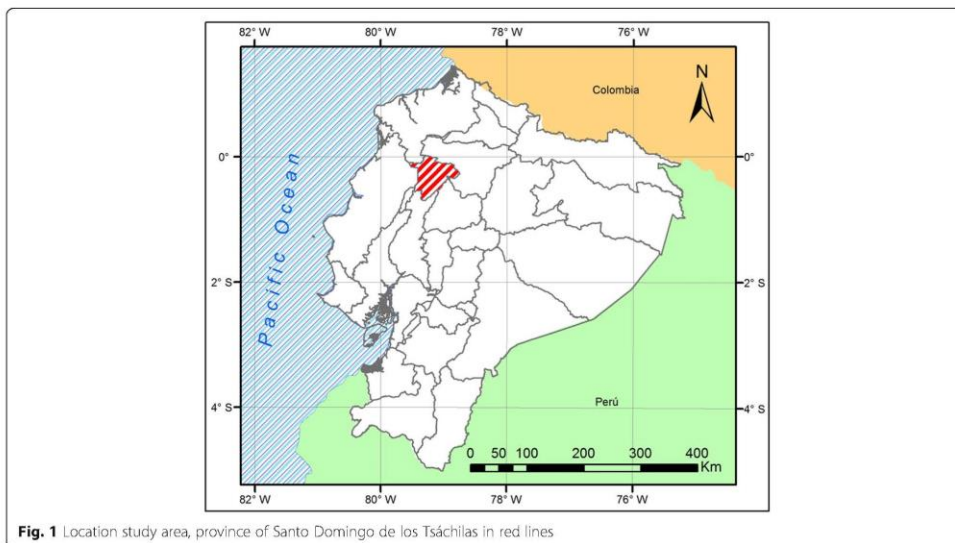
Genomic DNA was extracted from 1 mL of blood using a protocol previously described by J Sambrook and DW Russell [19]. Extracted DNA was eluted in 100 µl Tris-borate EDTA (TBE) and stored at -80 °C until further analysis. DNA concentration was determined using a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA) b at 260 nm.

### PCR of *msp5* and 16S rRNA genes

In order to perform the PCR allowing the detection of *msp5* gene, 100 ng of each sampled DNA were used. The PCR primer and technique used has been described previously [17, 20, 21] with some modifications. A total volume of 25 µL was composed of 2.5 PCR buffer, 0.5 U Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), 1 µM of each primer (Ana 19A/Ana 19B or RYaF16S/RYaR16S, Invitrogen™, as shown in Table 1 Invitrogen™), 0.2 mM of each nucleotide (dATP, dTTP, dCTP and dGTP; Invitrogen™) and 2.5 mM of MgCl<sub>2</sub>. The program used for *msp5* gene in the thermal cycler (TC-512 TECHNE) consisted in: 5 min-incubation at 94 °C, followed by 35 cycles of 45 s at 94 °C, 30 s at 64 °C and 1 min at 72 °C. A final 10 min-extension at 72 °C ended the program. For 16S rRNA PCR, 68 °C was used for hybridization and the extension time was changed 1.5 min. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gel in TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) and visualized with SYBER® Safe DNA in a UV-transilluminator.

### Cloning

Two µL of each PCR sample (An-SD-1 and An-SD-18) were ligated to TOPO TA vector (TOPO TA Cloning®



**Table 1** Sequence of primers used for amplification of *msp5* gene and 16S rRNA

Primer	5'-3' Sequence	Temp. hybrid	Target	Reference and target
Ana 19A	GTGTTCTGGGGTACTCCTA	64 °C	MSP5	Reyna-Bello et al., 1998
Ana 19B	TGATCTGGTCAGCCCCAGCT			
RYaF16S	TAACACATGCAAGTCGAACGG	68 °C		Chacón 2012
RYaR16S	ACCCAACCTTAAATGGTCGC			
M13 F	ACATTCCAGCAGCAGTTC GAG	63 °C	Fragment inserted into the plasmid	Invitrogen™
M13 R	CACGTGAATCCTCAATTTTGT			

kit, Invitrogen™), following manufacturer's instructions. Subsequently, electroporation was performed with the Gene Pulser Xcell™ (BIORAD™), according to the protocol described by the manufacturer, for the transformation of *E.coli* with ligated plasmid. Once the cells were electroporated, 1 mL SOC medium (composed of 2% Tryptone peptone, 0.5% yeast extract, 100 mM NaCl, 2.5 mM KCL, 100 mM MgCl<sub>2</sub> and 100 mM MgSO<sub>4</sub> at pH 7) was added and placed one hour for stirring at 225 rpm in a 15 mL-centrifuge tube placed horizontally. Later, 50 µL of cloning were spread on LBP Petri dishes (prepared according to Sambrook and Russell, [19]) containing 50 µg/mL Kanamycin [SIGMA™], 40 µL of 40 mg/mL X-Gal (Invitrogen™) and 40 µL 100 mM IPTG (Invitrogen™); it was further stored 24 h at 37 °C.

#### Purification of plasmid DNA of transformed dh5α *E. coli*

In all transformations of *E.coli*, 3 colonies were selected by colony PCR using the protocol described above using primers Ana 19A and B. These colonies were seeded in 10 mL LB culture medium [19] in the presence of 20 µg/mL Kanamycin (SIGMA™) for 24 h. Afterwards, cells were recovered through centrifugation of 3 mL from the culture at 10,000 xg for 10 min; plasmid DNA was further extracted from the pellet by a PureLink kit (K210010, Invitrogen™, USA).

#### Sequencing

Extracted plasmid DNAs were sent to MacroGen™ sequencing company (Seoul, South Korea), in order to sequence the cloned fragments, using forward and reverse M13 universal primers.

#### Sequence analysis

Cloning sequences were analyzed, cut and aligned in order to establish the consensus sequences with the MEGA6 Software; later, these consensus sequences were submitted to the BLAST database (NCBI Blastn) for identification and similarity.

#### Statistical analyses

At first, the disease prevalence was estimated, both at farm and individual levels. A farm was categorized as

positive if at least one PCR-*msp5* tested positive among all samples analyzed. On the other hand, the influence of gender as possible risk factor was assessed by estimating Odds Ratios (ORs). Statistical analyses were performed with Epi Info 7™ and R software.

#### Results

Our transversal study was performed in December 2014; 151 bovine blood samples were collected in 15 dairy farms located in the commune Luz de América, province of Santo Domingo de los Tsáchilas, in Ecuador's coastal region. The sample size reached 49.5% of all animals present in the farms ( $N = 305$ ). No sampling bias was to be considered, as the maximal proportion reached 25.2% ( $N = 38$ ) in SD-4 farm. Males represented 11.9% ( $N = 18$ ) of animals sampled.

Prevalence reached 100% at herd level and 86.1% at individual level (130 positive animals). Herd prevalence ranged from 40.0% (2/5) in SD-7 farm, to 100% in farms SD-4 (38/38), SD-8 (14/14), SD-9 (3/3) and SD-13 (5/5). No significant difference was observed between males and females ( $P > 0.05$ ; OR = 1.94 for females; CI = 0.57–6.62) when considering *msp5* PCR results (males = 77.0% and females = 87.2%). Table 2 summarises the distribution of samples and results of *msp5* PCR analysis.

Out of all samples positive by *msp5* PCR ( $N = 130$ ), two samples (An-SD-1 y An-SD-18) were selected in order to identify the rickettsia with 16S rRNAr PCR and further cloning and sequencing. Once consensus sequences were obtained for each clone, they were compared: sequences had 1383 bp and showed a 100% identity. After consulting Blast Database (NCBI Blastn), a 100% similarity was identified with GenBank (access number CP000030.1), registered for St Maries strain of *A. marginale* by Brayton and collaborators in 2005 [22].

#### Discussion

Bovine anaplasmosis is a disease commonly reported on the five continents. The rickettsia is transmitted through biological and mechanical vectors, but also iatrogenically. The disease is considered as endemic in tropical and subtropical areas and responsible for economic losses in cattle herds [2, 7]. Nevertheless, no report of *A.*

**Table 2** Summary of results obtained per farm by PCR for the detection of *A. marginale* *msp5* gene

Parameter	Animals present in the farm (N)	Animals sampled		Positive PCR $msp5$		
		N	% per farm	% sampled	N	%
Sex						
Male		18	11.9		14	77.8
Female		133	88.1		116	87.2
Farm						
SD-1	47	12	25.5	8.0	8	66.7
SD-2	15	6	40.0	4.0	5	83.3
SD-3	10	10	100.0	6.6	8	80.0
SD-4	38	38	100.0	25.2	38	100.0
SD-5	20	9	45.0	6.0	8	88.9
SD-6	7	7	100.0	4.6	5	71.4
SD-7	5	5	100.0	3.3	2	40.0
SD-8	20	14	70.0	9.3	14	100.0
SD-9	3	3	100.0	2.0	3	100.0
SD-10	3	3	100.0	2.0	2	66.7
SD-11	35	12	34.3	8.0	10	83.3
SD-12	14	4	28.6	2.7	3	75.0
SD-13	40	5	12.5	3.3	5	100.0
SD-14	20	12	60.0	8.0	10	83.3
SD-15	28	11	39.3	7.3	9	81.8
TOTAL	305	151	49.5	100.0	130	86.1

N = number

*marginale* in Ecuadorian cattle has ever been published in indexed journals to date. Only few studies were issued in local journals and dissertations.

Our transversal study aimed at assessing the prevalence of bovine anaplasmosis, both at herd and individual levels in a district of Ecuador coastal region. The presence of *A. marginale* was assessed by using a standardized PCR for *msp5* gene amplification, according to a procedure previously described [20].

All herds were identified as being positive, along with a high proportion of infected animals per herd from 40 to 100%. Our result confirms the fact that anaplasmosis is endemic in the area of study with 86.1%, as it is the case in other tropical and subtropical regions of Latin America [23]. A second PCR was developed to amplify the rickettsia 16S rRNA gene in two samples positive by *msp5* PCR. After cloning and sequencing, the 1400 bp fragment showed a 100% homology with St. Maries strain of *A. marginale* [22]. Such result allow us to conclude that *A. marginale* is present in Ecuadorian cattle; the sequence we operated is commonly used to perform taxonomy among bacteria of the Order Rickettsiales, Family Anaplasmataceae [10, 24].

It is important to mention that no farm provided more than 50% of samples. In this study, there was a total of 151 animals, 18 (11.9%) were males while 133 (88.1%) were females due to the dairy characteristic of farms. However, sex was not identified as a risk factor, which confirms previous results [25].

Significant differences were highlighted between farms for what PCR/*msp5* results are concerned: 40% of results were positive in SD-7 farm vs. 100% in SD-4, SD-10 and SD-12 farms. It is not surprising, the longer animals remain in a farm, the higher the risk of transmission. The localization of farms has probably influenced the distribution of the disease. In the area of study, 86.1% of animals were positive for *A. marginale* without clinical signs (anaemia, fever or more than 1% *A. marginale* in smear) suggesting the circulation of *A. marginale* in apparently healthy animals or persistent infection [6]. And due to the high prevalence found, the concept of enzootic stability can also be used [4].

The PCR usually detects DNA traces from previous infections, however, in the case of bovine anaplasmosis this is not true because once *A. marginale* infects an animal, it becomes infected for years [6] allowing us to infer that a positive PCR animal is still infected with *A. marginale*.

On the other hand infection by blood parasites such as *Trypanosoma vivax*, *Babesia bovis* or *Babesia bigemina*, frequently identified in Latin America, causes a clinical picture quite similar, worthless from a diagnostic point of view (Reyna-Bello, 2014). PCR test is seen as an alternative for these cases, or for persistently infected animals [9, 20, 26]. The gene encoding *msp5* has been used in numerous PCR trials [20, 27], due to the fact that, as a single copy, it is highly conserved in all *A. marginale* isolates [9, 28].

In endemic areas, clinical cases are rarely observed, most often in naïve animals recently introduced (and coming from free areas). Animals persistently infected can be responsible for outbreaks in a naïve herd, when moved to a disease-free area where vectors are present [2]. The high prevalence of anaplasmosis estimated in the area of study and for previous reports of 85.5% in cattle sampled in Quevedo canton, province of Los Ríos [15] and 91.7% in cattle slaughtered in Quito Metropolitan Slaughterhouse [16], places the lowlands of Ecuador in enzootic stability for bovine anaplasmosis.

The moderate prevalence (68%) reported by Muñoz and collaborators in cattle of Zamora, Canton [14] is probably related to the lower sensitivity of the test used, i.e. blood smear, compared to PCR or ELISA [9]. Another study performed in the Galápagos Islands reported a 64.1% prevalence estimated by a commercial competitive ELISA (VMRD Inc.™) in a sample of 184 animals [29].

In neighbouring countries, anaplasmosis was reported to be present at prevalence rates similar to our study. In Colombia, for example, a 90.3% prevalence obtained by agglutination test was reported [30]; the performance of an ELISA using *msp5* recombinant protein as antigen revealed a prevalence ranging between 47% [17] and 94% [31, 32] in Venezuela. In Costa Rica, a prevalence ranging from 20.0 to 72.0% was estimated by using an ELISA/MSP5r kit (VMRD Inc.<sup>™</sup>) [25] while a prevalence of 15% was estimated in Texas, with the same kit [33]. Indeed, such differences in prevalence have been mentioned by other authors [1].

The distribution of the rickettsia depends on the presence of vectors, which are arthropods belonging to the Ixodidae family; the most important belong to the genera *Dermacentor* and *Rhipicephalus*. In Latin America, the tick most widely distributed is *Rhipicephalus microplus*, which is known as vector of *A. marginale* [4]. Nevertheless, in Latin America, the epidemiological importance of ticks as vectors is controversial: the transmission by blood sucking dipterans, such as horseflies, would play a more important role [4, 5]. Distribution and prevalence of anaplasmosis are directly related with the epidemiological role played by the different vectors. *Dermacentor albipictus* was mentioned as the main vector of the disease in Texas [33]. In Latin America, the predominating tick is *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. microplus*), which does not seem to be an efficient vector for *A. marginale* [4, 7]. Transmission of anaplasmosis was mentioned to be mainly operated by blood sucking dipterous, iatrogenic or vertical transmission in Latin America [7, 34]. Vertical transmission would depend on the type of strain involved but infecting until 25% of calves and sometimes causing their death [35, 36]. On the other hand, Scoles and collaborators (2008) reported that *Dermacentor andersoni* was more efficient in transmitting *A. marginale* than horseflies. Nevertheless, the relationship between pathogen and vector has not been studied widely in Latin America yet (Baldacchino et al., 2014). While it is true, *R. microplus* happens to be an efficient vector, but to be species-specific (one sole host) limits its vector capacity in Latin America and Africa, where it is the predominating species [23].

In this regard, differences between *A. marginale* strains have been described in the world; some strains of Florida and Mississippi are not transmitted by ticks [1].

A study carried out in Costa Rica pointed out the presence of horseflies as the major risk factor for bovine anaplasmosis, not the ticks presence [25]. It is possible that, like what happened when *T. vivax* ‘travelled’ from Africa to Latin America more than 100 years ago, it adapted from a transmission by Tse Tse fly in Africa to a horsefly transmission in America, after gene deletion in

its kinetoplast [37]. *Anaplasma marginale* might also have adapted itself to vectors existing in Central and South America, which would explain such a high prevalence of the disease in the region.

## Conclusion

The high prevalence observed at farm and animal levels, as well as the molecular characterization of *A. marginale* in Ecuador, would allow to clarify the epidemiological situation of this hemotrophic, but also to better focus its diagnosis, treatment and control in Ecuador.

## Abbreviations

16S rRNA: 16S of ribosomal RNA; *A. marginale*: *Anaplasma marginale*; ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay; MSP5: Mayor Surface Protein 5; ORs: Odds Ratios; PCR: Polymerase Chain Reaction; *R. microplus*: *Rhipicephalus microplus*

## Acknowledgements

We would like to thank all farmers who participated in this study.

## Funding

This work was supported by the ‘Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de la República del Ecuador’ (SENESCYT), in the framework of Dr. Armando Reyna-Bello’s ‘Proyecto Prometeo’, and the ‘Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE’, through funding by the ‘Unidad de Gestión de la Investigación – UGI’.

## Availability of data and materials

The DNAs analyzed during this study are available in the Laboratorio de Biotecnología Animal, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

## Authors’ contributions

LT, KN, JR, MCH and ARB collected cattle samples, LT, KN carried out the PCR and LT drafted the manuscript. JR, carried out the statistical analysis and participated in preparation of the manuscript. ARB and MACH develop the idea of this research and help with the preparation and revision of the manuscript. All authors have read and approved the final version of this manuscript.

## Ethics approval and consent to participate

The study was conducted according to the ethical rules of the Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE and was approved by its ethics committee (reference number 2014-PIC-045), and the cattle samples were obtained under veterinary supervision. The cattle were owned by farms located in the Luz de America Community at Sto. Domingo de los Tsáchillas Province. Before sampling, the study objectives, schedule and work methodology were explained to the farmers. 15 farmers were involved in the study and all 15 gave their verbal consent for their cattle to be used in this study. This consent included the serological sampling of the cattle and we also provided sanitary-epidemiologic information about the farms and also about the animals. After our study, each farmer received the results and our recommendations from his farm.

## Consent for publication

Not applicable

## Competing interests

Authors declare that they have no competing interests.

## Publisher’s Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## Author details

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador. <sup>2</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera

Ingeniería Agropecuaria, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador.  
<sup>3</sup>Investigador-Prometeo, Departamento de Ciencias de la Vida, Carrera Ingeniería en Biotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador.  
<sup>4</sup>Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE, Av. General Rumiñahui s/n, P.O.BOX: 171-5-231, Sangolquí, Ecuador.

Received: 28 April 2017 Accepted: 28 November 2017  
 Published online: 15 December 2017

References

- Suarez CE, Noh S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Vet Parasitol.* 2011;180(1–2):109–25.
- Reyna-Bello A: Anaplasmosis bovina: logros y retos inmediatos. In: Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito. Volume Cap LXXIV, edn. Edited by C González-Stagnaro NM, E Soto Belloso: Fundación GIRARZ. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela; 2014: 703–710.
- Zivkovic Z, Nijhof AM, de la Fuente J, Kocan KM, Jongejan F. Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male Dermacentor reticulatus. *BMC Vet Res.* 2007;3:32.
- Guglielme AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in south and central America. *Vet Parasitol.* 1995;57(1–3):109–19.
- Coronado A: Is *Boophilus microplus* the main vector of *Anaplasma marginale*? *Revista Científica, FCV-LUZ* 2001, XI(5):408–411.
- Brown WC, Barbet AF. Persistent infections and immunity in ruminants to arthropod-borne bacteria in the family Anaplasmataceae. Annual review of animal biosciences. 2016;4:177–97.
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 2010;167(2–4):95–107.
- Aubry P, Geale DW. A review of bovine anaplasmosis. *Transbound Emerg Dis.* 2011;58(1):1–30.
- Corona B, Dasiel Obregón D, YA YAI, Iñonso P, Vega E, Díaz A, Martínez S. Tendencies in diagnostic of bovine anaplasmosis. *Rev Salud Anim.* 2014; 36(2):73–9.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and ‘HGE agent’ as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(Pt 6):2145–65.
- OIE: Bovine anaplasmosis. In: *OIE Terrestrial Manual*. edn. Edited by OIE; 2012: 589–600.
- Cárdenas RE, Jaime Buestán J, Dangles O. Diversity and distribution models of horse flies (Diptera: Tabanidae) from Ecuador. *Ann soc entomol Fr.* 2009; 45(4):511–28.
- Pesquera C, Portillo A, Palomar AM, Oteo JA. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapis, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasit Vectors.* 2015;8:46.
- Muñoz TR, Ayora P, Jiménez V. Prevalencia de Anplasma marginale mediante extendidos sanguíneos en el cantón Zamora, provincia de Zamora Chinchipe. *Centro de Biotecnología.* 2014;3(1):44–51.
- Escobar A, Cevallos O, Patricio Villarreal P, Carranza M, Carranza H, Pinargote E. Prevalence and detection by nested PCR of *Anaplasma marginale* in cattle and tick in the center of the coast of Ecuador. *Ciencia y Tecnología.* 2015;8(1):11–7.
- Soto K: Determinación de la prevalencia de Anaplasmosis en el ganado bovino faenado en la Empresa Metropolitana de Rastro de Quito (EMRQ) mediante la aplicación de las técnicas de diagnóstico: Microscopía de Frotis Sanguíneos, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Rinsayo Inmunoenzimático Competitivo (cELISA). Escuela Politécnica del Ejército; 2010.
- Reyna-Bello A, Cloeckaert A, Vizcaino N, Gonzatti MI, Aso PM, Dubray G, Zygmunt MS. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1998;5(2):259–62.
- GAD, Domingo, S. 2016, Ecuador, R.d., ed. (<http://www.santodomingo.gob.ec/>).
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual, 3. EDN. 2001;
- Tavares-Marques L, Reyna-Bello A. Estandarización de la técnica de PCR para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina y ovina. *Agronomía Trop.* 2006; 56(4):501–12.
- Chacón: Identificación Molecular de organismos Rickettsiales en caninos de diferentes regiones de Venezuela. In: *Facultada de Ciencias, Escuela de Biología. Licenciatura: Universidad central de Venezuela*; 2013: 122.
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP, Jr.: Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(3):844–849.
- Kocan KM, de la Fuente J, Guglielme AA, Melendez RD. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(4):698–712.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* 2007;69(2):330–9.
- Oliveira JB, Montoya J, Romero JJ, Urbina A, Soto-Barrientos N, Melo ES, Ramos CA, Araujo FR. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. *Vet Parasitol.* 2011;177(3–4):359–65.
- Figuerola JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol.* 1993; 50(1–2):69–81.
- Torioni de Echaide S, Knowles DP, TC MG, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of clinical microbiology.* 1998;36(3):777–82.
- Visser ES, McGuire TC, Palmer GH, Davis WC, Shkap V, Pipano E, Knowles DP Jr. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect Immun.* 1992;60(12): 5139–44.
- Monroy MF: Determinación de la seroprevalencia de *Anaplasma marginale*, a través del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) en la población Bovina de la provincia de Galápagos-Ecuador. San Francisco de Quito; 2015.
- Patarollo JH, Villa O, Diazgranados H. Epidemiology of cattle anaplasmosis in Colombia: I prevalence and distribution of agglutinating antibodies. *Trop Anita Hlth Prod.* 1978;10:171–4.
- Eleizalde M, Caballero H, Reyna-Bello A. Evaluación y mejoramiento del ensayo inmunoenzimático (elisa) para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina, utilizando la msp5 recombinante como antígeno. *Revista Científica, FCV-LUZ.* 2007;17(4):349–56.
- Eleizalde MC, Reyna-Bello A. Mechanisms of antigenic variation in *Anaplasma marginale*. *Rev Fac Cs Vets UCV.* 2014;55(2):112–23.
- Hairgrove TB, Craig TM, Budke CM, Rodgers SJ, Gill RJ. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in Texas cattle. *Preventive veterinary medicine.* 2014; 116(1–2):188–92.
- Baldacchino F, Desquesnes M, Mihok S, Foil LD, Duvallet G, Jittapapong S. Tabanids: neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2014;28:596–615.
- Grau HE, Cunha Filho NA, Pappen FG, Farias NA. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinária.* 2013;22(2):189–93.
- Costa SC, de Magalhaes VC, de Oliveira UV, Carvalho FS, de Almeida CP, Machado RZ, Munhoz AD. Transplacental transmission of bovine tick-borne pathogens: frequency, co-infections and fatal neonatal anaplasmosis in a region of enzootic stability in the northeast of Brazil. *Ticks and tick-borne diseases.* 2016;7(2):270–5.
- Greif G, Rodríguez M, Reyna-Bello A, Robello C, Alvarez-Valin F. Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. *Mutat Res.* 2015; 773:69–82.

---

# Section expérimentale

## **Etude 2 :**

**First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador**

---

*Transbound Emerg Dis.* 2021;68:2422–2428

María Augusta Chávez-Larrea, Michell Lorena Medina-Pozo, Cristina E. Cholota-Iza, Jimmy R. Jumbo-Moreira, Claude Saegerman, Freddy Proaño-Pérez, Jorge Ron-Román and Armando Reyna-Bello

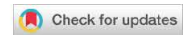
## *Préambule*

En Équateur, deux études ont montré la présence d'anticorps contre *T. vivax*. La première mention de ce parasite remonte à 1977, où, grâce à l'application de la technique d'immunofluorescence, 22,5 % des bovins échantillonnés ont été trouvés positifs (Wells et al., 1977). Une autre étude réalisée en 2017 a montré une prévalence de 31.03% grâce à l'application d'un ELISA indirect (Medina-Naranjo et al., 2017).

Depuis 2014, au sein du Laboratoire de Biotechnologie Animale de l'ESPE, une ligne de recherche a été établie pour l'étude des agents hémotropes chez les animaux de ferme tels que *Anaplasma* spp. *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp. L'une des premières étapes a été la standardisation des techniques de diagnostic moléculaire PCR et sérologique ELISA. En novembre 2017, l'agence nationale de contrôle de la santé animale de l'Équateur (AGROCALIDAD) a signalé la mort d'animaux sans cause apparente dans la zone de Chone, dans la province de Manabí (région côtière). En janvier 2018, une équipe du laboratoire de biotechnologie animale a visité 3 élevages dans la zone du foyer, et 20 échantillons de sang ont été prélevés.

Trois échantillons ont été testés positifs par amplification PCR d'un fragment de la protéase à cystéine de type CatL de *T. vivax* et l'analyse phylogénétique des isolats a montré qu'ils étaient étroitement liés à des isolats d'Amérique du Sud et d'Afrique de l'Ouest. Cette étude a caractérisé pour la première fois *T. vivax* chez les bovins en Équateur.

Lors de la visite des fermes, une évaluation clinique des animaux échantillonnés a été effectuée consistant en la prise de température corporelle, l'observation de la présence de muqueuses pâles et d'hémoglobinurie. L'évaluation vétérinaire a déterminé la présence de muqueuses pâles et d'augmentation de la température chez deux des trois animaux positifs au CatL-PCR. Lors de la visite des élevages, la présence de mouches hématophages à proximité des animaux a été confirmée, ainsi que les pratiques de gestion comme la réutilisation des seringues.



Received: 2 June 2020 | Revised: 25 October 2020 | Accepted: 27 October 2020

DOI: 10.1111/tbed.13906

## ORIGINAL ARTICLE

Transboundary and Emerging Diseases

WILEY

# First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador

María Augusta Chávez-Larrea<sup>1,2\*</sup> | Michell Lorena Medina-Pozo<sup>1</sup> | Cristina E. Cholota-Iza<sup>1</sup> | Jimmy R. Jumbo-Moreira<sup>1</sup> | Claude Saegerman<sup>2</sup> | Freddy Proaño-Pérez<sup>1,3</sup> | Jorge Ron-Román<sup>4</sup> | Armando Reyna-Bello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí, Ecuador

<sup>2</sup>Research Unit of Epidemiology and Risk analysis applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULg), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liege, Belgium

<sup>3</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador

<sup>4</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí, Ecuador

**Correspondence**

Armando Reyna Bello, Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Santo Domingo de los Tsáchilas, Ecuador.  
Email: aareyna@espe.edu.ec

**Funding information**

Academy of Research and Higher Education, Grant/Award Number: Establishment of a support platform for training a; Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE

**Abstract**

The bovine trypanosomosis is responsible for economic losses from tropical and subtropical areas of Africa and Latin America. This disease is characterized by fever, anaemia, loss of production and even death. Few studies have been carried out in Ecuador regarding *Trypanosoma* spp. presence but the species has not been determined in cattle and those have only determined the presence of genus, but not the species. The aim of this study was to identify and characterize the trypanosome species involved in the suspected bovine trypanosomosis outbreak reported in Convento Village in Manabí Province located in the coastal region of Ecuador. Twenty cattle from three farms were sampled. Three samples were positive for *T. vivax*, using an end-point polymerase chain reaction (PCR) to amplify a fragment of the cathepsin L-like cysteine protease (CatL-like) gene. A phylogenetic tree analysis of these three Ecuadorian isolates showed a close relationship with isolates from South America (Colombia, Brazil and Venezuela) and West Africa (Nigeria). This is the first report of *T. vivax* in Ecuadorian cattle.

**KEYWORDS**

bovine trypanosomosis, cattle, Ecuador, *Trypanosoma vivax*

## 1 | INTRODUCTION

Protozoa of the genus *Trypanosoma* are haemotropic agents widely reported in cattle from Latin America. In this region,

*Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma theileri* and *T. vivax* are the identified species (Desquesnes, 2004). Of these, *T. vivax* is the most pathogenic, causing anaemia, fever, weight loss, reproductive problems in males and females, and low production (Gonzatti

María Augusta Chávez-Larrea and Michell Lorena Medina-Pozo are contributed equally to this manuscript.

<sup>†</sup>Disclaimer: The views expressed in this article are those of the authors and do not necessarily reflect the official policy or position of the Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

et al., 2014; Pereira et al., 2018; Ramírez-Iglesias et al., 2017). The mortality varies from 3% to 50%, depending on the species involved, the breed, and the immune status of the infected cattle (Desquesnes, 2004).

In South America, *T. vivax* has been reported in several countries such as French Guyana, Venezuela, Colombia, Peru, Brazil, Bolivia, Argentina and Paraguay (Gonzatti et al., 2014; Paoletta et al., 2018). Once this hemoflagellate was established in the Americas in the absence of the Tse-tse fly, *T. vivax* developed a new adaptive pathway, with modifications in the kinetoplast genome such as large deletions of the *ND7* and *COIII* genes, and frameshifts of the *ND1*, *ND2* and *ND4* genes (Greif et al., 2015).

High prevalence of *T. vivax* has been reported in Colombia (23%), determined by molecular testing (García et al., 2014); as well in two areas of the Bolivian Pantanal (27.79% and 19.03%; Gonzales et al., 2007). In Colombia, economic losses due to bovine trypanosomosis were reported to reach USD 5.2 million per year (Gonzatti et al., 2014).

In Ecuador, livestock is one of the most representative activities in the agricultural sector with approximately 4.1 million cattle distributed in the four natural regions: 48.4% in the highlands (milking cattle), 42.4% in the coastal region (dual purpose, beef/milk) and 9.13% in the jungle and Galapagos Islands (dual purpose, beef/milk). Manabí Province is located in the coastal region and contains the highest percentage of cattle (22.7%) in the country (INEC, 2019).

Because of its geographical location, Ecuador offers favourable ecological conditions for vector development, that is *Tabanus*, *Stomoxys calcitrans* and *Haematobia irritans* (Cárdenas et al., 2009). Furthermore, reports of *T. vivax* in countries in the region, including neighbours such as Colombia and Peru, suggest the probability of the presence of this hemoflagellate in Ecuador.

In July 2017, an outbreak of bovine trypanosomosis was reported in Chone Canton in Manabí Province, according to AGROCALIDAD (Regulation and Control fito-zoosanitaria Agency from Ecuador).

Bovine trypanosomosis in Ecuador is a neglected disease, like other haemotropic diseases such as anaplasmosis and babesiosis, which are evidenced in the few studies that have been carried out. However, bovine trypanosomosis seroprevalence has been reported in two studies. In a first study carried out in 1977, a seroprevalence of 22.5% was found using immunofluorescence (Wells et al., 1977). In a second study, performed 40 years later, the authors reported a prevalence of 31% using an iELISA (Medina-Naranjo et al., 2017).

According to FAO (2018), the presence of haemotropic diseases is a factor that limits efficient livestock production, reducing profitability for farmers. The aim of this study was to identify and characterize the trypanosome species involved in the bovine trypanosomosis outbreak reported in Manabí Province, using molecular methods in order to later establish specific control and treatment programs to minimize the impact of this hemoflagellate.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Identification of trypanosomosis outbreaks

In order to identify trypanosomosis outbreaks, epidemiological reports from AGROCALIDAD and information from the Livestock Association of Convento Village were evaluated. Through this method, an outbreak of bovine trypanosomosis in July 2017 was identified in Manabí Province.

### 2.2 | Samples

In January 2018, the Association of Convento Village was visited, after AGROCALIDAD reported an outbreak of trypanosomosis. During this visit, only three farmers reported some cattle with clinical signs compatible with trypanosomosis and allowed admission for veterinary evaluation. The criteria for sampling were the suspicion of the farmer about the presence of the disease in some animals and veterinary observation of clinical signs such as pale mucosa, weakness, decrease of milk production and fever.

In total, 20 blood samples were collected in tubes with EDTA from the coccygeal vein of suspected cattle: in farm UVB ( $n = 6$ ), farm LP ( $n = 10$ ) and farm FM ( $n = 4$ ). Samples were temporarily stored at 4°C, until their processing and final storage at -80°C at the Laboratory of Animal Biotechnology of the Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Quito, Ecuador.

### 2.3 | DNA extraction

DNA extraction from blood samples was performed by using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega). DNA integrity was verified on a 0.8% agarose gel and concentration of DNA was quantified by UV spectrophotometry, using the NanoDrop 2000 kit (Thermo Fisher Scientific).

### 2.4 | TviCatL-PCR for diagnostic of *Trypanosoma vivax*

The end-point polymerase chain reaction (PCR), which amplifies a fragment of the cathepsin L-like cysteine protease (CatL-like) gene, was used to identify *T. vivax*, and the primers used were TviCatL: 5-GCC ATC GCC AAG TAC CTC GCC GA-3; and DTO155: 5-TTA AAG CTT CCA CGA GTT CTT GAT GAT CCA GTA-3, described by Cortez et al., (2009). The total reaction added up to a volume of 25  $\mu$ l, composed of 1X Buffer +  $Cl_2Mg$ , 0.5  $\mu$ M of each primer, 0.8 mM dNTPs, 2.5 U of Dream Taq Polymerase (Thermo Scientific) and 100 ng of DNA.

PCR was carried out in a C1000 touch thermal cycler Bio-Rad®. Cycling conditions comprised an initial activation step of 94°C for

5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, hybridization at 65°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s, with a final extension step of 72°C for 10 min. To verify the reliability of the results, a positive control donated by the Universidad Simón Rodríguez de Venezuela was used in each PCR round. Finally, a horizontal electrophoresis was performed using a 2% agarose gel with the PCR products stained using SYBR Safe (Life Technologies Pty Ltd), which were visualized and recorded in the ChemiDoc equipment (BIO-RAD).

## 2.5 | Sequencing

The amplicons of positive samples were purified using a QIAquick® Gel Extraction kit (Qiagen). Each sample was divided into three tubes and sequenced using the Sanger technique at Magrogen company in Seoul, South Korea. The nucleotide sequences obtained were aligned and edited by BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999) to obtain the consensus sequences, and later used to interrogate the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) with the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The consensus sequences evaluated were uploaded to the GenBank (Accession numbers MT547173, MT547174 and MT547175).

## 2.6 | Phylogenetic analysis

Phylogenetic relationships were established by analysing the catalytic domain sequences of cathepsin L-like (CatL-like) obtained in this study, with others retrieved from GenBank database and previously described (Cortez et al., 2009; Jacson et al., 2012; Jaimes-Dueñez et al., 2018) and the database (<http://bioinformatica.fcien.edu.uy/Tvivax/>) obtained from the analysis of the transcriptome *T. vivax* isolated LIEM- 176 from Venezuela (Greif et al., 2013). Therefore, a multiple alignment was performed using MUSCLE tool from MEGA X program (Kumar et al., 2018). Finally, the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model tree were performed (Kumar et al., 2018).

## 3 | RESULTS

The three selected farms had an extensive husbandry system, characterized by free grazing in large areas. Cattle from these farms were crossbred *Bos taurus* and *Bos indicus*, used for dairy production. Unfortunately, the sanitary management in farms related to the use of drugs was difficult to record, because they had only an incipient record of production and reproduction.

**TABLE 1** Characteristics and *Trypanosoma vivax* TviCatL-PCR results for the 20 cattle sampled in Convento Village, Manabí province, Ecuador

Farm code	Cattle identification	Animal characteristics			Clinical signs			PCR result
		Sex	Age <sup>a</sup>	Breed	Mucosa	T°	Haematuria	
FM	Clavel	M	36	CB	Normal	38.9	No	-
	Art 4	M	7	CB	Normal	39.5	No	-
	Paleta	F	ND	CB	Normal	39.7	No	-
	<b>Leo</b>	<b>F</b>	<b>60</b>	<b>CB</b>	<b>Pale</b>	<b>39.6</b>	<b>No</b>	<b>+</b>
LP	Abuelita	F	48	CB	Normal	ND	No	-
	Colorada	F	48	CB	Normal	ND	No	-
	Mico	M	36	CB	Normal	ND	No	-
	Beto	M	72	CB	Normal	40.9	No	-
	Chana	F	36	CB	Pale	38.8	No	-
	<b>Mona</b>	<b>F</b>	<b>84</b>	<b>CB</b>	<b>Pale</b>	<b>40.3</b>	<b>No</b>	<b>+</b>
	Estefy	F	48	CB	Pale	38.0	No	-
	Dayana	F	48	CB	Pale	39.3	No	-
	<b>Michu</b>	<b>F</b>	<b>48</b>	<b>CB</b>	<b>Normal</b>	<b>39.4</b>	<b>No</b>	<b>+</b>
Negro pintado	M	18	CB	Normal	39.2	No	-	
UVB	Panchana	M	15	CB	Normal	39.0	No	-
	Art 5134	F	42	CB	Pale	38.3	No	-
	Vaca 1	F	40	CB	Pale	38.6	No	-
	Café	M	15	CB	Pale	40.1	No	-
	Venado	M	12	CB	Pale	39.7	No	-
	Maduro	M	16	CB	Normal	39.4	No	-

Abbreviations: -, negative; +, positive; CB, crossbreed; F, female; M, male; ND, not determinate; T°, temperature in degree Celsius.

The lines highlighted in bold are the TviCatL-PCR positive results.

<sup>a</sup>Age in months.

In the veterinary evaluation, out of the 20 sampled cattle, 7 had temperatures over 39.5°C, and 9 had pale mucosa. The breed, age, sex, mucosa and temperature are recorded in Table 1.

DNA concentrations measured after extraction were in the range of 118–991 ng/μl, and the absorbance ratios A260/280 and A260/230 varied in the ranges of 1.78–1.94 and 1.80–2.4, respectively. These parameters are considered optimal for subsequent PCR analysis.

Of the 20 samples, three were positive for trypanosomes as analysed with TviCatL-PCR by amplifying a DNA 189–190 pb fragment compatible with *T. vivax* as previously described by Cortez et al., (2009). The three positive animals were found in two of the three sampled herds (Table 1).

Regarding the homology of amplicons evaluated by BLAST, we obtained 100% identity in the catalytic domain of CatL-like gene of *T. vivax* between the sequences from the used database and those obtained in this study. These sequences were recorded in GenBank with the accession numbers MT547173, MT547174 and MT547175 corresponding to samples M5, M14 and M17, respectively.

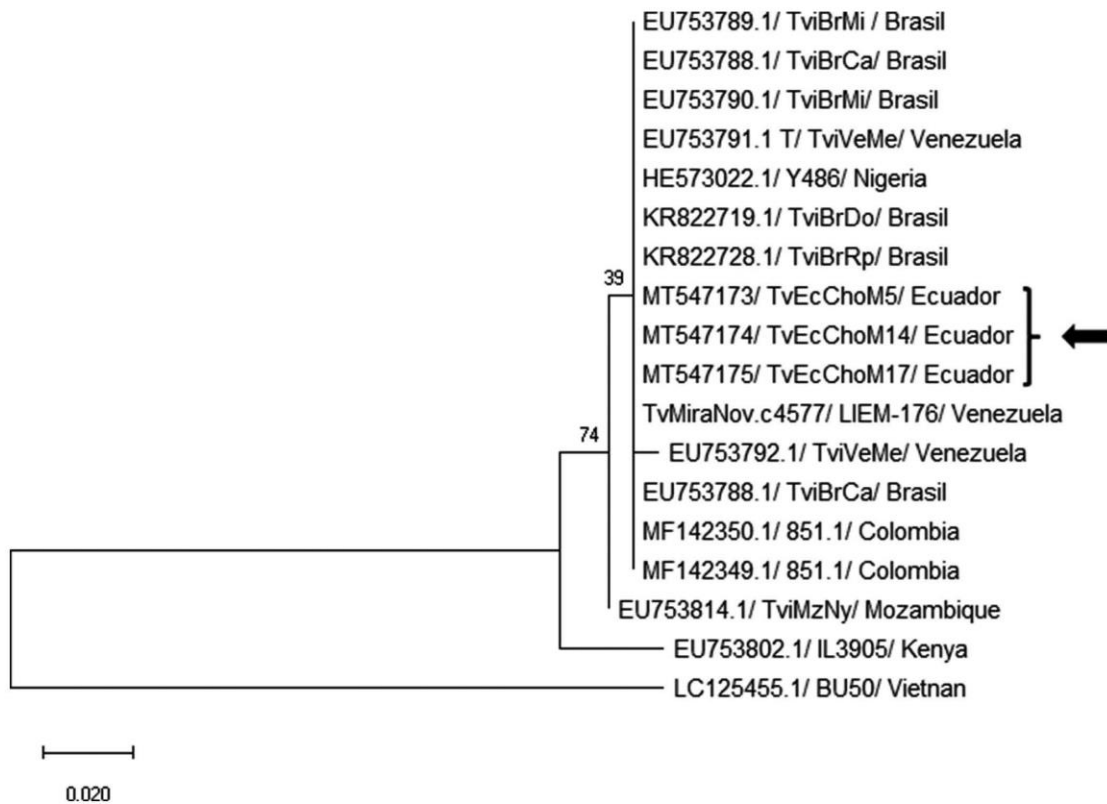
Phylogenetic analysis of the Ecuadorian isolates of *T. vivax* showed a close relation with isolates reported in South America and West Africa (Figure 1).

#### 4 | DISCUSSION

This study demonstrated the presence of *T. vivax* in an outbreak that occurred in Convento Village in the coastal area of Ecuador, being the first scientific report of this parasite in the country. It was identified by TviCatL-PCR specific for *T. vivax* and characterized via DNA sequencing of PCR amplified product.

TviCatL-PCR of 20 samples identified *T. vivax* in 3 of them. This is evidence for the presence of *T. vivax* in the area, which suggests this parasite is the causative agent of the outbreak, together with the presence of some clinical signs compatible with bovine trypanosomosis.

The TviCatL-PCR test has turned out to be a highly sensitive and specific test in studies of genetic diversity of *T. vivax* from Africa and America (Cortez et al., 2009). This method has also been used to identify *T. vivax* in other animal species, such as wandering donkeys



**FIGURE 1** Maximum likelihood method and Tamura-Nei model tree using catL-like catalytic domain sequences from geographical isolates of *T. vivax* from Africa (Nigeria, Mozambique and Kenya) and South America (Brazil, Colombia, Venezuela and Ecuador). *T. theileri* catL was used as the out group. Taxa names consist in GeneBank code/isolates of *T. vivax*/geographical origin. Arrows indicate the Ecuadorian sequences of isolates reported in this article. The scale represents the genetic distance between analysed samples

18851882, 2021, 4, Downloaded from https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.13906 by Universitat De Lleida, Wiley Online Library on [16/07/2021]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

in Brazil, where a similar genotype in cattle and sheep was found (Rodrigues et al., 2015). Likewise, other studies using PCR have been widely used, showing the capacity of the technique in epidemiological studies such as in Ethiopia (Birhanu et al., 2015).

Phylogenetic analysis of Maximum Likelihood in Ecuadorian isolates of *T. vivax* revealed a similarity with those from Western Africa and South America. The phylogenetic tree showed a 100% identity for the three Ecuadorian isolates, probably because all of them are from the same outbreak and closely related to those reported in Brazil, Venezuela, Colombia, Nigeria and Mozambique, but they are separate from isolates from Kenya, which are in another clade (Figure 1). This finding has also been reported for other isolates from Latin America (Cortez et al., 2009; Jaimes-Dueñez et al., 2018).

The introduction of trypanosomosis to South America could have been produced by infected cattle from Senegal, which were brought to farms in French Guyana and Antilles (Gonzatti et al., 2014), and from there to Ecuador. It is possible that the presence of *T. vivax* in Convento Village could be related to entry of cattle from some endemic areas. Other outbreaks of *T. vivax* in cattle have already been reported in countries of the region due to the high mobility of animals. Indeed, in the state of Zulia in Venezuela, an outbreak was declared 12 days after the introduction of Zebu cattle from Colombia without the corresponding sanitary controls or quarantine (Gonzatti et al., 2014; Simoes et al., 2009).

The presence of both pale mucosa and increase of temperature was observed in two of three TviCatL-PCR positive animals. Seven animals which showed pale mucosa were negative for TviCatL-PCR, possibly due to nutritional factors or previous unrecorded treatment. Reports indicate that anaemia could be an important appealing sign of trypanosomosis; for example, in cattle from dairy herds in Brazil, it was present in 46.66% of infected animals and 7.78% in healthy animals (Cuglovici et al., 2010). This clinical sign has also been recorded in sheep, which in experimental infections showed severe anaemia (Parra-Gimenez & Reyna-Bello, 2019). In the description of this process, the trans-sialidase enzymes trigger erythrophagocytosis by desialylating the glycophorin, causing anaemia during illness (Guegan et al., 2013). It has also been described as mechanical and biochemical damage of the erythrocyte membrane directly through the effect of the hemoflagellate during the parasitemia (Boada-Sucre et al., 2016).

The presence of *T. vivax* in the area of the outbreak could be explained by the occurrence of *Tabanus* (Jaimes-Dueñez et al., 2017), as it has been showed in a Colombian study (Jaimes-Dueñez et al., 2018). In addition, when the farms were visited, some management practices in cattle were seen, such as the reuse of syringes which may have contributed to iatrogenic transmission (Desquesnes, 2004).

Other haematropic agents in the coastal region of Ecuador, that is *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp. (Medina-Naranjo et al., 2017; Tana-Hernández et al., 2017) added to nutritional problems and stress, and could have caused the loss of enzootic balance in cattle from Convento Village. Similar cases have been reported in water buffaloes from Venezuela. Indeed, a

trypanosomosis outbreak occurred in water buffaloes in 2015 during a stressful scarcity of green forage due to a drought season, along with concurrent infections with *Anaplasma* sp. and *Babesia* sp (Garcia et al., 2016).

## 5 | CONCLUSION

This study showed, for the first time, the presence of *T. vivax* in two herds in Ecuador and draw the attention about tripanosomosis in livestock in the coastal and jungle regions of Ecuador which have the optimal conditions for the parasite development (Medina-Naranjo et al., 2017). Therefore, the next step is to estimate the prevalence of *T. vivax* and risk factors associated, and characterize potential vectors for its transmission to determine whether epidemiological surveillance and control programs against trypanosomosis are necessary in Ecuador.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank all farmers who participated in the study. This study had the technical, scientific and financial support of the Universidad de las Fuerzas Armadas—ESPE, and was supported by the Academy of Research and Higher Education (ARES) through the Research for Development Project (PRD) entitled 'Establishment of a support platform for training and awareness raising, diagnosis and development of a strategy for the control of brucellosis and trypanosomiasis in Ecuador'.

## CONFLICT OF INTEREST

None of the authors has financial or personal conflict of interest related to this study.

## ETHICAL APPROVAL

The authors have a permit for intervention on the farms during the outbreak delivered by AGROCALIDAD, and authorization to use the information through the informed consent of farmers.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## ORCID

Claude Saegerman  <https://orcid.org/0000-0001-9087-7436>

Armando Reyna-Bello  <https://orcid.org/0000-0003-0846-5745>

## REFERENCES

- Birhanu, H., Fikru, R., Said, M., Kidane, W., Gebrehiwot, T., Hagos, A., Alemu, T., Dawit, T., Berkvens, D., Goddeeris, B. M., & Büscher, P. (2015). Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions. *Northern Ethiopia. Parasites & Vectors*, 8(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0818-1>
- Boada-Sucre, A. A., Rossi Spadafora, M. S., Tavares-Marques, L. M., Finol, H. J., & Reyna-Bello, A. (2016). *Trypanosoma vivax*

- adhesion to red blood cells in experimentally infected sheep. *Pathology Research International*, 2016, 4503214. <https://doi.org/10.1155/2016/4503214>
- Cárdenas, R. E., Buestán, J., & Dangles, O. (2009). Diversity and distribution models of horse flies (diptera: Tabanidae) from Ecuador. *Annales De La Société Entomologique De France*, 45(4), 511–528. <https://doi.org/10.1080/00379271.2009.10697633>
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America - characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>
- Cuglovic, D. A., Bartholomeu, D. C., Reis-Cunha, J. L., Carvalho, A. U., & Ribeiro, M. F. B. (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>
- Desquesnes, M. (2004). Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. *World Organisation for Animal Health*.
- FAO (2018). Shaping the future of livestock sustainably, responsibly, efficiently. *10th Global Forum for Food and Agriculture, January*, 20.
- García, H. A., Ramírez, O. J., Rodrigues, C. M. F., Sánchez, R. G., Bethencourt, A. M., Del M. Pérez, G., Minervino, A. H. H., Rodrigues, A. C., & Teixeira, M. M. G. (2016). *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan Llanos: An unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. *Veterinary Parasitology*, 230, 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.013>
- García, L. T., Ardila, Y. A., Rincón, D., Durán, C., & Aguilar, J. R. (2014). A new PCR-RFLP for species-specific diagnosis of south American animal trypanosomiasis. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 9(2), 128–136. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2014.128.136>
- Gonzales, J., Chacon, E., Miranda, M., Loza, A., & Siles, L. (2007). Bovine trypanosomosis in the Bolivian Pantanal. *Veterinary Parasitology*, 146(1–2), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.010>
- Gonzatti, M. I., González-Baradat, B., & Reyna-Bello, A. (2014). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In S. Magez, & M. Radwanska (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis* (pp. 261–269). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5>
- Greif, G., Ponce de Leon, M., Lamolle, G., Rodriguez, M., Piñeyro, D., Tavares-Marques, L. M., Reyna-Bello, A., Robello, C., & Alvarez-Valin, F. (2013). Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC Genomics*, 14(1), 149. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-149>
- Greif, G., Rodriguez, M., Reyna-Bello, A., Robello, C., & Alvarez-Valin, F. (2015). Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 773, 69–82. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.008>
- Guegan, F., Plazolles, N., Baltz, T., & Coustou, V. (2013). Erythrophagocytosis of desialylated red blood cells is responsible for anaemia during *Trypanosoma vivax* infection. *Cellular Microbiology*, 15(8), 1285–1303. <https://doi.org/10.1111/cmi.12123>
- Hall, T. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium, Serie No. 95–98*.
- INEC (2019). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2018. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadísticas\\_agropecuarias/espac/espac-2018/Presentacion-de-principales-resultados.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadísticas_agropecuarias/espac/espac-2018/Presentacion-de-principales-resultados.pdf)
- Jackson, A. P., Berry, A., Aslett, M., Allison, H. C., Burton, P., Vavrova-Anderson, J., Brown, R., Browne, H., Corton, N., Hauser, H., Gamble, J., Gilderthorp, R., Marcello, L., McQuillan, J., Otto, T. D., Quail, M. A., Sanders, M. J., van Tonder, A., Ginger, M. L., ... Berriman, M. (2012). Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(9), 3416–3421. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117313109>
- Jaimes-Dueriez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2017). Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with 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-Dueriez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 249(52), 30–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Medina-Naranjo, L., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L., Campo, A., Román-Ron, J., Moyano, J., Jarrín-Porras, E., Sandoval-Morejón, E., & Chávez-Larrea, M. (2017). Diagnóstico de los Hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. mediante las técnicas de ELISA y PCR en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica Universidad Del Zulia Venezuela XXVII* (3), 162–171.
- Paoletta, M. S., López Arias, L., de la Fournière, S., Guillemi, E. C., Luciani, C., Sarmiento, N. F., Mosqueda, J., Farber, M. D., & Wilkowsky, S. E. (2018). Epidemiology of *Babesia*, *Anaplasma* and *Trypanosoma* species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 9(2), 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.011>
- Parra-Gimenez, N., & Reyna-Bello, A. (2019). Parasitological, hematological, and immunological response of experimentally infected sheep with venezuelan isolates of *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Trypanosoma vivax*. *Journal of Parasitology Research*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/8528430>
- Pereira, H. D., Simões, S. V. D., Souza, F. A. L., Silveira, J. A. G., Ribeiro, M. F. B., Cadioli, F. A., & Sampaio, P. H. (2018). Clinical and epidemiological aspects and diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in a cattle herd, state of Maranhão. *Brazil. Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(5), 896–901. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5303>
- Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Reyna-Bello, A., & Mendoza, M. (2017). Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: Evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(2), 450–458. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0826-x>
- Rodrigues, C. M., Batista, J. S., Lima, J. M., Freitas, F. J., Barros, I. O., Garcia, H. A., Rodrigues, A. C., Camargo, E. P., & Teixeira, M. M. (2015). Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semiárid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. *Parasites and Vectors*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1169-7>
- Simoes, D., Sánchez, M., González, Y., Rivera, F., Parra, R., Gil, M., García, M. E., & Quijada, J. (2009). Brote de tripanosomosis en un rebaño doble propósito del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Ciencia*, 17(2), 124–132.

- Tana-Hernández, L., Navarrete-Arroyo, K., Ron-Román, J. W., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 392. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1311-1>
- Wells, E., Betancourt, A., & Ramirez, L. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71, 448–449. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90055-4)

**How to cite this article:** Chávez-Larrea MA, Medina-Pozo ML, Cholota-Iza CE, et al. First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transbound Emerg Dis*. 2021;68:2422–2428. <https://doi.org/10.1111/tbed.13906>

---

## Section expérimentale

### **Etude 3 :**

**Detection of *Babesia* spp. in high altitude cattle in Ecuador, possible evidence of the adaptation of vectors and diseases to new climatic conditions**

---

*Pathogens* 2021, 10:1593

María A. Chávez-Larrea, Cristina Cholota-Iza, Viviana Medina-Naranjo, Michelle Yugcha-Díaz, Jorge Ron-Román, Sarah Martin-Solano, Gelacio Gómez-Mendoza, Claude Saegerman and Armando Reyna-Bello

## *Préambule*

La babésiose est une maladie causée par un protozoaire spécifiquement adapté aux tiques. L'espèce *Rhipicephalus microplus* est la principale tique transmettant *B. bigemina* et *B. bovis* chez les bovins en Amérique du Sud. Le changement climatique est une réalité qui affecte plusieurs régions de la planète, ce qui pourrait générer de nouveaux sites géographiques de distribution des vecteurs modifiant les cycles de vie des parasites vectorisés, ainsi que la gestion des systèmes de production.

Dans la présente étude, un foyer de *Babesia* spp chez les bovins (n=143) a été traité dans une ferme située à 2469 m d'altitude appartenant à la ville de Quito, province de Pichincha (région de la Sierra) où la présence de ce parasite n'a pas été signalée. En outre, la prévalence de ce protozoaire a été évaluée chez les bovins (n=264) de la zone d'El Carmen dans la province de Manabí (Région de la Côte) à partir de 20 fermes. Pour le diagnostic des *Babesia* spp, la RFLP-PCR a été utilisée pour la détection du fragment ADNr 18S, puis les amplicons ont été coupés avec des enzymes de restriction pour l'identification de *B. bovis* et *B. bigemina*.

Les résultats ont montré que le 20,28 % (29/143) des bovins du foyer étaient positifs et 18,94 % (50/264) des bovins d'El Carmen étaient positifs. Cette étude a également montré que l'âge, le sexe et la race ne sont pas des facteurs de risque de présence de *Babesia* spp. dans la région d'El Carmen, mais dans la région de Quito, l'un des facteurs était l'âge des animaux. En revanche, au moment de l'attention du foyer, trois animaux présentaient des signes cliniques tels que : température élevée, muqueuses pâles et ganglions lymphatiques gonflés, dont deux étaient positifs à *B. bovis*.

Ce travail a démontré la première caractérisation moléculaire de *B. bigemina* et de *B. bovis* chez les bovins en Équateur, et constitue également la première preuve de la présence de *Babesia* spp. chez les bovins à une altitude de 2 469 m.s.n.m.

## Article

# Detection of *Babesia* spp. in High Altitude Cattle in Ecuador, Possible Evidence of the Adaptation of Vectors and Diseases to New Climatic Conditions

María A. Chávez-Larrea <sup>1,2</sup>, Cristina Cholota-Iza <sup>2</sup> , Viviana Medina-Naranjo <sup>2</sup>, Michelle Yugcha-Díaz <sup>2</sup> , Jorge Ron-Román <sup>3</sup>, Sarah Martin-Solano <sup>2</sup> , Gelacio Gómez-Mendoza <sup>4</sup>, Claude Saegerman <sup>1,\*</sup>  and Armando Reyna-Bello <sup>2,\*</sup>



**Citation:** Chávez-Larrea, M.A.; Cholota-Iza, C.; Medina-Naranjo, V.; Yugcha-Díaz, M.; Ron-Román, J.; Martin-Solano, S.; Gómez-Mendoza, G.; Saegerman, C.; Reyna-Bello, A. Detection of *Babesia* spp. in High Altitude Cattle in Ecuador, Possible Evidence of the Adaptation of Vectors and Diseases to New Climatic Conditions. *Pathogens* **2021**, *10*, 1593. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121593>

Academic Editors: Vett Lloyd and Natasha Rudenko

Received: 3 November 2021  
Accepted: 6 December 2021  
Published: 8 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- <sup>1</sup> Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULiège), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; machavezlarrea@student.uliege.be
  - <sup>2</sup> Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí P.O. Box 171-5-231, Ecuador; cecholota@espe.edu.ec (C.C.-I.); vivi.1292@live.com (V.M.-N.); emyugcha@espe.edu.ec (M.Y.-D.); ssmartin@espe.edu.ec (S.M.-S.)
  - <sup>3</sup> Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí P.O. Box 171-5-231, Ecuador; jwron@espe.edu.ec
  - <sup>4</sup> Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura Extensión Santo Domingo, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Sangolquí P.O. Box 171-5-231, Ecuador; gagomez@espe.edu.ec
- \* Correspondence: claude.saegerman@uliege.be (C.S.); aareyna@espe.edu.ec (A.R.-B.)

**Abstract:** Background: *Babesia* species are intraerythrocytic protozoa, distributed in tropical and subtropical areas of the world, causing anemic diseases in many animals, including cattle. This disease, called babesiosis, is transmitted from one animal to another through ticks (Tick Borne-Disease or TBD). On the other hand, Ecuador has a tropical climate that allows the development of the vector *Rhipicephalus microplus*, and therefore favors the transmission of *Babesia* spp. in cattle. Methods and principal findings: We determined the presence of *Babesia* spp. by PCR using 18s ribosomal gene as target (18s PCR) in 20 farms in the area of El Carmen (zone below 300 m above sea level) and 1 farm in Quito (2469 m.a.s.l.). In addition, we analyzed parameters such as age, sex, and packed cell volume (PCV) as explanatory variable associated with the disease. Results: The 18s PCR test showed that 18.94% (14.77% *Babesia bovis* and 4.17% *Babesia bigemina*) and 20.28% (14.69% *B. bovis* and 5.59% *B. bigemina*) of the cattle were positive for *Babesia* spp in farms sampled in El Carmen and in Quito, respectively. Age influenced the presence of animals positive for *Babesia* spp., but sex and PCV did not. The phylogenetic analysis of sequences showed 4 isolates of *B. bovis* and 3 isolates of *B. bigemina* in the 2 study zones, with similarities between 99.73 and 100% with other sequences. One *B. bovis* isolate was similar in the zone of El Carmen and Quito. Conclusion and significance: This work is the first molecular characterization of *B. bigemina* and *B. bovis* in Ecuador, and it is also the first evidence of *Babesia* spp. in cattle in the area of Quito at an altitude of 2469 m.a.s.l., being the highest altitude reported for animals with babesiosis and for the tick *R. microplus*. Climatic factors as well as mobility of tick-carrying animals without any control allow the presence of Babesiosis outbreaks in new geographical areas.

**Keywords:** babesiosis; *Babesia bovis*; *Babesia bigemina*; cattle; *R. microplus*

## 1. Introduction

Babesiosis, a disease caused by intraerythrocytic protozoa of the genus *Babesia* spp., affects a wide variety of domestic and wild animals and even birds [1]. Two species,

*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*, are present in cattle in Central and South America [2]. The main clinical manifestations in cattle are fever, anemia, hemoglobinuria, and nervous signs associated with sequestration of infected erythrocytes in the microcapillaries of the brain [2,3].

Bovine babesiosis is found in Latin American countries such as Venezuela, Colombia, Peru, and Brazil [4–7]. In the state of Santa Catarina-Brazil, cattle presented high prevalences of *B. bovis* (29%) and *B. bigemina* (16%) [8]. Similarly, water buffaloes showed prevalences of 16.2% for *B. bovis* and 24% for *B. bigemina* in the county of Papaloapan, state of Veracruz, Mexico [9].

The presence of ticks and tick-associated diseases generate economic losses not only due to decreased production, mortality, and control [10], but also in animal trade [2]. *Rhipicephalus microplus* (*R. microplus*) is described as the main vector of *Babesia* spp. in South America [2,4,11]. For example, in Brazil, in 2011, *R. microplus* caused a decrease in milk and meat production, resulting in economic losses of US\$3.24 million [12].

*R. microplus* ticks cohabit with cattle in tropical and subtropical areas, resulting in the presence of persistently infected cattle [3]. In Europe, climatic conditions such as humidity and temperature would limit the distribution of ticks such as *I. ricinus* [13]. In Central and South America, optimal environmental conditions such as climate, soil and cattle biotypes favor *R. microplus* populations as well as the infection rate of cattle and ticks [4].

Studies in Latin America have shown that climatic conditions and altitude influence indirectly the distribution and prevalence of *Babesia* spp. In Bolivia, cattle at altitudes of 300 to 1300 m above sea level have a higher risk of babesiosis than those at altitudes of 700 to 2000 m above the sea level (m.a.s.l) [14]. In Colombia, *Babesia* spp. infection values are higher in cattle, buffaloes, and ticks, during and at the end of the rainy season [7]. Recent findings suggest that “climate change” could be modifying the habitats of ticks, evidencing their presence in areas where they have not been traditionally reported, increasing the possibilities of babesiosis outbreaks [1].

Ecuador is located in the equatorial zone and has several bioclimatic levels ranging from over 2000 m.a.s.l (Andean Cordillera) to lowlands at sea level with tropical climates [15], which facilitate the presence of ticks, becoming a problem in cattle production systems. The presence of ticks was found in 88% of cattle farms in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas, with a predominance of *R. microplus* (83%) and *Amblyomma cajenense sensu lato* (s.l.) (21%) [16]. In addition, molecular tests as Polymerase Chain Reaction (PCR) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) demonstrated the presence of *B. bovis*, *B. bigemina*, and mixed infections in ticks (*R. microplus*) [16–18]. On the contrary, the use of a PCR test using ribosomal 18s as a target (PCR) with primers described by Carret et al., 1999 [19], did not demonstrate the presence of *Babesia* spp. in cattle in the province of Pastaza, in the Amazon region of Ecuador, since this is a tick-free zone [20].

Since there is no national program for the control of ticks and tick-borne diseases in Ecuador, producers use different strategies, products, and doses for the treatment against ticks, which has generated problems of resistance to acaricides [16,21].

The aim of this study was to demonstrate the detection and molecular characterization of *Babesia* spp. in cattle from two study areas (coastal area in the province of Manabi; and mountain area in the province of Pinchincha—study of a clinical outbreak), as possible evidence of the adaptation of the vector and the disease to high altitude climates.

## 2. Results

In the El Carmen area, 18.94% (50/264) of the cattle were positive for *Babesia* spp. by PCR. Of the 264 cattle, 14.77% (39/264) were positive for *B. bovis* and 4.17% (11/264) for *B. bigemina*. Of the 143 cattle from the Quito farm, 20.28% (29/143) were positive to *Babesia* spp. by PCR, and 14.69% (21/143) were positive to *B. bovis* and 5.59% (8/143) to *B. bigemina* using restriction enzyme analysis (Table 1).

**Table 1.** Presence of *Babesia* spp., in the canton El Carmen province of Manabí and in the canton Quito province of Pichincha, Ecuador.

Farm Code	Total Animals Present on the Farm	Sample		Positive <i>Babesia</i> spp.		Positive <i>B. bovis</i>		Positive <i>B. bigemina</i>	
				PCR 18s		Restriction Enzymes		Restriction Enzymes	
		No	% by Farm	No	%	No	%	No	%
<b>El Carmen-Manabí Zone</b>									
F-1	8	8	100	1	12.5	1	12.5	0	0
F-2	21	5	23.8	0	0	0	0	0	0
F-3	16	7	43.8	0	0	0	0	0	0
F-4	194	39	20.1	0	0	0	0	0	0
F-5	43	6	14	0	0	0	0	0	0
F-6	152	17	11.2	0	0	0	0	0	0
F-7	6	4	66.7	2	50	2	50	0	0
F-8	60	20	33.3	7	35	4	20	3	15
F-9	112	36	32.1	8	22.2	6	16.7	2	5.6
F-10	38	8	21.1	0	0	0	0	0	0
F-11	16	16	100	7	43.8	6	37.5	1	6.3
F-12	165	28	17	2	7.1	2	7.1	0	0
F-13	17	9	52.9	0	0	0	0	0	0
F-14	27	25	92.6	6	24	3	12	3	12
F-15	8	4	50	0	0	0	0	0	0
F-16	5	5	100	1	20	0	0	1	20
F-17	2	2	100	0	0	0	0	0	0
F-18	17	6	35.3	3	50	3	50	0	0
F-19	27	12	44.4	9	75	8	66.7	1	8.3
F-20	9	7	77.8	4	57.1	4	57.1	0	0
All farms	943	264	28	50	18.93	39	14.77	11	4.17
<b>Quito-Pichincha Zone</b>									
F-1	164	143	87, 20	29	20, 28	21	14, 69	8	5, 59

Legend: No: number; %: percentage; PCR: Polymerase chain reaction. In bold are the totals in column identified with “No” and the average in column with %, respectively.

In El Carmen, 85.61% (226/264) of the total animals sampled were females. For the distribution of animals by age, information was only available for 183 animals. Of the animals positive for *Babesia* spp., 42.86% were found in the 10 to 18 months age group. Regarding the distribution of positive animals, there was no significant difference for sex (Fisher’s Exact test;  $p$ -value = 0.38) and age group (Fisher’s Exact test;  $p$ -value = 0.48). *R. microplus* ticks were present in 21.59% (57/264) of the cattle.

Of the total number of animals ( $n = 143$ ) sampled from Cantón Quito, 95.10% (136/143) were females. As for the age distribution, there was a significant difference (Fisher’s Exact test;  $p$ -value = 0.004). There were 72.41% (21/70) of the *Babesia* spp. positive animals in the 19 to 36 months age group and no positive animals were found in the 0 to 9 months age group (Table 2). No significant difference was found in relation to sex (Fisher’s exact test;  $p$ -value = 0.35) since the number of males was low (5%), thus this variable was not an explanatory factor (Table 2).

In Quito, three cattle showed symptoms at the time of the visit to the farm, two of which were positive for *B. bovis*. The three animals were females and had been separated from the herd because they presented symptoms such as decay, prostration, and temperature. They received treatment based on Imidocarp (Imicar<sup>®</sup>, Imidocarb dipropionate 12 g), using 2.5 mL/100 kg of weight. At the time of the inspection, the presence of *R. microplus* ticks was found in the three animals and clinical and zootechnical information was collected (Table 3).

**Table 2.** Distribution of samples and analysis of risk factors: sex and age groups for bovine *Babesia* spp. in Ecuador.

Variables	Sample		Positive		Fisher's Exact Test (p-Value)
	Number	%	Number	%	
<b>El Carmen-Manabí Zone (n = 264)</b>					
Sex					0.38
Male	38	14.39	5	13.16	
Female	226	85.61	45	19.91	
Age group					0.48
0 to 9	21	7.95	6	28.57	
10 to 18	7	2.65	3	42.86	
19 to 36	18	6.82	4	22.22	
>36 months	137	51.89	29	21.17	
ND	81	30.68	8	9.88	
<b>Quito-Pichincha Zone (n = 143)</b>					
Sex					0.35
Male	7	4.9	0	0	
Female	136	95.1	29	21.32	
Age group					0.004
0 to 9	26	18.18	0	0	
10 to 18	27	18.88	4	13.79	
19 to 36	70	48.95	21	72.41	
>36 months	20	13.99	4	13.79	

Legend: The % value corresponds to the total number of animals sampled in the area or in each farm; ND, not determined.

**Table 3.** Clinical information of three symptomatic bovines in the farm of Cantón Quito.

No	Farm Code	Age	Weight	T	PCV	Heart Rate	Respiratory Rate	Other Clinical Findings	Positive <i>B. bovis</i> by PCR
1	425	12	232	39.5	19	84	47	Pale mucous membranes, swollen cervical glands	–
2	433	15	199	39	16	85	64	Salivation, pale mucous membranes, jaundice	+
3	38	15	202	40	29	100	57	Swollen groin glands	+

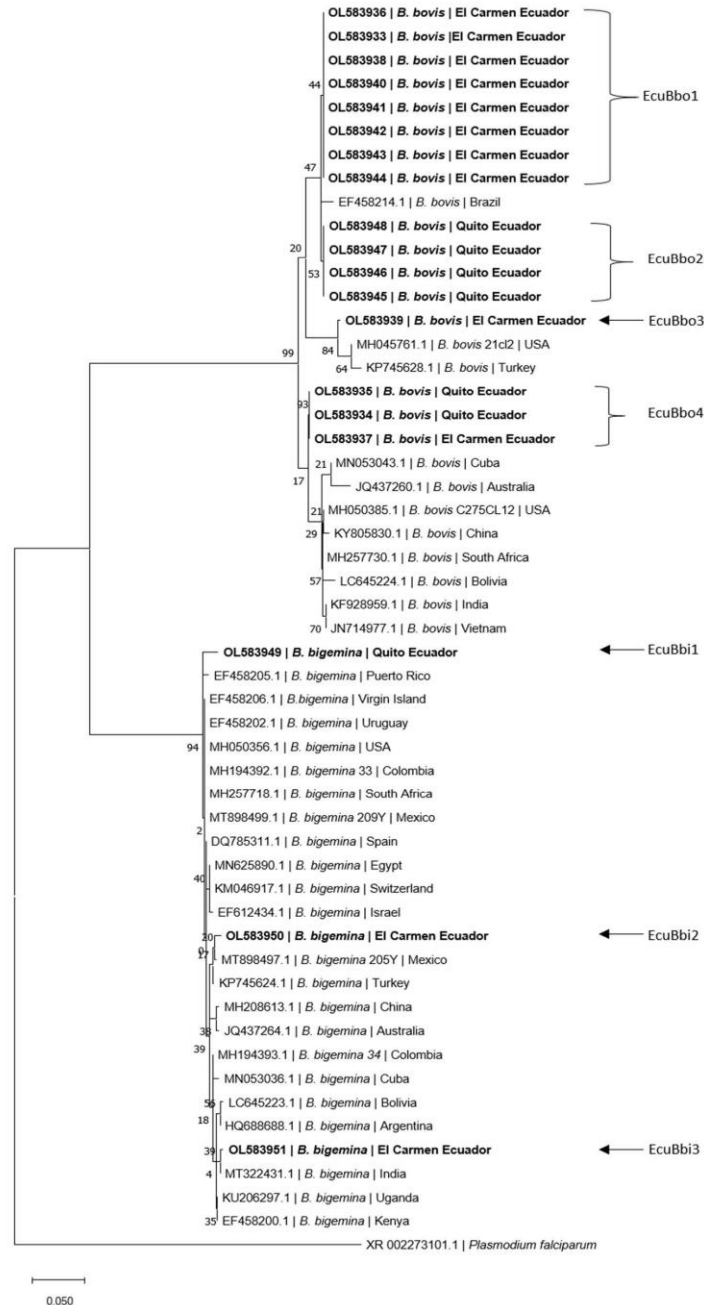
Legend: Age in months; Weight in kilograms; T°: temperature in Celsius degree; PCV: packed cell volume (values less than or equal to 24% is related to anemia); PCR: polymerase chain reaction; –: negative; +: positive.

In the examination of the rest of the animals (140), no cattle had placket cell volume (PCV) values less than or equal to 24%, but 2 animals had a body temperature of 39.3 °C and 39.9 °C and these animals were positive for *B. bovis*.

Both Quito and El Carmen were exclusively dairy farms. In El Carmen, there were animals with crossbreeds of *Bos indicus* (Brahman, Gyr, Nelore) and *Bos taurus* (Brown suis, Hosltein, Charolais). In Quito, the animals were *Bos taurus* and there were crossbred animals of Brown suis, Hosltein and Jersey breeds.

#### Phylogenetic Analysis

Of the consensus sequences (n = 19) evaluated in BLAST, 10 samples from El Carmen and 6 from Quito showed similarity to the 18s rRNA of *B. bovis*, while 2 samples from El Carmen and 1 from Quito had similarity to *B. bigemina* (Figure 1).



**Figure 1.** Maximum likelihood, 3-parameter Tamura [22] phylogenetic tree of the 18s rRNA gene sequences of *B. bovis* and *B. bigemina* from Ecuador. It involved 54 nucleotide sequences and a total of 519 positions in the final data set. The following terminology was used to identify the isolates: Ecu = Ecuador, Bbo = *B. bovis*, Bbi = *B. bigemina* and the isolate number. Taxa names consist in GeneBank code/isolates of *Babesia* spp./geographical origin.

In El Carmen, of the 10 sequences identified as *B. bovis*, 8 were identical (EcuBbo 1), while the remaining 2 (EcuBbo 2 and EcuBbo 3) differed from each other, as well as from isolate EcuBbo 1. The two sequences of *B. bigemina* were also different from each other (EcuBbi 1 and EcuBbi 2). In Quito, of the six sequences identified as *B. bovis*, four sequences were identical forming the EcuBbo 4 isolate and the remaining two sequences were identical to the EcuBbo 2 isolate from El Carmen. The sequence of *B. bigemina* formed an isolate EcuBbi 3 that differs from El Carmen sequences (Table 4).

**Table 4.** Percentage of identity of *B. bovis* and *B. bigemina* species found in El Carmen and Quito.

Study Areas	Ecuadorian Code	Isolated	Species	Total Score	Identity Percentage	Query Coverage	No. Access Gen Bank
El Carmen (province of Manabi)	M5	EcuBbo 1	<i>B. bovis</i>	684	100%	98%	OL583933
	M92						OL583936
	M100						OL583938
	M149						OL583940
	M154						OL583941
	M187						OL583942
	M245						OL583943
	M279						OL583944
	M97	EcuBbo 2	<i>B. bovis</i>	684	100%	98%	OL583937
	M103	EcuBbo 3	<i>B. bovis</i>	678	99.73%	98%	OL583939
Quito (province of Pinchincha)	M232	EcuBbi 1	<i>B. bigemina</i>	717	99.74%	99%	OL583950
	M260	EcuBbi 2	<i>B. bigemina</i>	721	99.75%	100%	OL583949
	85	EcuBbo 2	<i>B. bovis</i>	684	100%	98%	OL583934
	86						OL583935
	310						OL583946
	300	EcuBbo 4	<i>B. bovis</i>	678	99.73%	98%	OL583945
314	OL583947						
315	OL583948						
260	EcuBbi 3	<i>B. bigemina</i>	701	98.98%	99%	OL583951	

Legend: The total score is the sum of alignment scores of all segments from the same database sequence that match the query sequence (calculated over all segments), the percent identity is a number that describes how similar the query sequence is to the target sequence, and the query cover is a number that describes how much of the query sequence is covered by the target sequence (taken from the National Center for Biotechnology Information, NCBI).

### 3. Discussion

In South America, *R. microplus* is widely distributed in the Mesoamerican corridor towards Venezuela and Colombia, and in southern Brazil and Argentina [23]. In Ecuador, data on tick ecology and distribution information are scarce [24]. The present study would be the first finding of *Babesia* spp. and *R. microplus* in a high altitude area, although the farm in Quito is not a preferred area for the tick due to its climatological and altitudinal characteristics [25]. Possibly, in this zone, the environmental temperature influences the adaptation process of the tick where the development phase can be extended (120 days) at temperatures of 18 °C [25]. Due to climate change in recent years, the abundance and distribution of ticks is increasing to new areas [26,27]. In India, ticks on domestic animals are absent at altitudes above 1900 m.a.s.l. However, in closer countries, such as Colombia, *Amblyomma cajennense* is recorded at a maximum altitude of 1771 m.a.s.l. [28]. For *Ixodes* spp., there are records of up to 2410 m.a.s.l. in Venezuela [29].

However, climate change alone should not be a determining factor in tick distribution. Other factors such as land use change [30], as well as the mobility of cattle, can also play an important role in the introduction of ticks to new areas and therefore the introduction of diseases such as *Babesia* spp. [26]. In the city of Quito, cattle arrive from various regions of the country to be butchered in slaughter centers, many of them are carriers of ectoparasites. This mobility without any control can introduce ticks to the pastures occasionally, which would be causing an enzootic instability for hemoparasites [25].

In El Carmen, of the 10 sequences identified as *B. bovis*, 8 were identical (EcuBbo 1), while the remaining 2 (EcuBbo 2 and EcuBbo 3) differed from each other, as well as from isolate EcuBbo 1. The two sequences of *B. bigemina* were also different from each other (EcuBbi 1 and EcuBbi 2). In Quito, of the six sequences identified as *B. bovis*, four sequences were identical forming the EcuBbo 4 isolate and the remaining two sequences were identical to the EcuBbo 2 isolate from El Carmen. The sequence of *B. bigemina* formed an isolate EcuBbi 3 that differs from El Carmen sequences (Table 4).

**Table 4.** Percentage of identity of *B. bovis* and *B. bigemina* species found in El Carmen and Quito.

Study Areas	Ecuadorian Code	Isolated	Species	Total Score	Identity Percentage	Query Coverage	No. Access Gen Bank
El Carmen (province of Manabi)	M5	EcuBbo 1	<i>B. bovis</i>	684	100%	98%	OL583933
	M92						OL583936
	M100						OL583938
	M149						OL583940
	M154						OL583941
	M187						OL583942
	M245						OL583943
	M279						OL583944
	M97	EcuBbo 2	<i>B. bovis</i>	684	100%	98%	OL583937
	M103	EcuBbo 3	<i>B. bovis</i>	678	99.73%	98%	OL583939
Quito (province of Pinchincha)	M232	EcuBbi 1	<i>B. bigemina</i>	717	99.74%	99%	OL583950
	M260	EcuBbi 2	<i>B. bigemina</i>	721	99.75%	100%	OL583949
	85	EcuBbo 2	<i>B. bovis</i>	684	100%	98%	OL583934
	86						OL583935
	310	EcuBbo 4	<i>B. bovis</i>	678	99.73%	98%	OL583946
	300						OL583945
314	OL583947						
315	OL583948						
260	EcuBbi 3	<i>B. bigemina</i>	701	98.98%	99%	OL583951	

Legend: The total score is the sum of alignment scores of all segments from the same database sequence that match the query sequence (calculated over all segments), the percent identity is a number that describes how similar the query sequence is to the target sequence, and the query cover is a number that describes how much of the query sequence is covered by the target sequence (taken from the National Center for Biotechnology Information, NCBI).

### 3. Discussion

In South America, *R. microplus* is widely distributed in the Mesoamerican corridor towards Venezuela and Colombia, and in southern Brazil and Argentina [23]. In Ecuador, data on tick ecology and distribution information are scarce [24]. The present study would be the first finding of *Babesia* spp. and *R. microplus* in a high altitude area, although the farm in Quito is not a preferred area for the tick due to its climatological and altitudinal characteristics [25]. Possibly, in this zone, the environmental temperature influences the adaptation process of the tick where the development phase can be extended (120 days) at temperatures of 18 °C [25]. Due to climate change in recent years, the abundance and distribution of ticks is increasing to new areas [26,27]. In India, ticks on domestic animals are absent at altitudes above 1900 m.a.s.l. However, in closer countries, such as Colombia, *Amblyomma cajennense* is recorded at a maximum altitude of 1771 m.a.s.l. [28]. For *Ixodes* spp., there are records of up to 2410 m.a.s.l. in Venezuela [29].

However, climate change alone should not be a determining factor in tick distribution. Other factors such as land use change [30], as well as the mobility of cattle, can also play an important role in the introduction of ticks to new areas and therefore the introduction of diseases such as *Babesia* spp. [26]. In the city of Quito, cattle arrive from various regions of the country to be butchered in slaughter centers, many of them are carriers of ectoparasites. This mobility without any control can introduce ticks to the pastures occasionally, which would be causing an enzootic instability for hemoparasites [25].

Previous studies in Ecuador demonstrated the presence of *Babesia* spp. in ticks, but not in cattle [16,18]. Our study shows for the first time *B. bovis* and *B. bigemina* in two geographical areas El Carmen and Quito, with a prevalence of 18.93% and 20.28%, respectively for *Babesia* spp. In both regions, *B. bovis* is more prevalent than *B. bigemina*. This is similar to those found in Brazil where a prevalence of 16% for *B. bigemina* and 29% for *B. bovis* was reported in cattle [8], but differs from that found in Colombia where a prevalence of 24.2% for *B. bigemina* and 14.4% for *B. bovis* was recorded [7]. Usually, tick infection rates are lower for *B. bovis* than for *B. bigemina* [2], which may allow tick survival and therefore favor transmission [31]. Moreover, *B. bovis* has a strong ability to survive against host immune pressure [32] and therefore, in the two study areas, *B. bovis* is more predominant. *B. bovis* and *B. bigemina* species can persist for several months and years with a low level of parasitemia in the host, which allows the long-term maintenance of the parasite in the environment and therefore the presence of persistently infected asymptomatic animals [31]. At the level of the bovine population, this condition originates a state called enzootic equilibrium, where no sick animals are observed [2], which is possibly what happened in the area of El Carmen. In the case of Quito, where clinically sick animals were observed, it is likely that there was a recent introduction of the parasite in the area, together with the presence of *R. microplus*, which resulted in the appearance of the outbreak, showing that this area is not in enzootic equilibrium. This imbalance in the host–parasite relationship would lead us to think that the presence of Babesiosis is relatively new in the area.

In South America, most of the outbreaks have been associated with *B. bovis* [4], which is consistent with what was found in the province of Pichincha, where symptomatic animals positive for *B. bovis* were found; this may be due to a delayed, inadequate, and insufficient immune response by the host [31], and to the pathogenicity of the parasite [4].

The age of cattle is correlated with the clinical stages of Babesiosis [2,5,31], so that young animals between 3 and 9 months are more resistant than adult animals [2]; in the Pichincha area the animals with symptomatology were older than 15 months of age. On the other hand, 42.18% of the asymptomatic animals in the El Carmen area belonged to the 10 to 18 months age group, and 28.57% were in the 0 to 9 months age group. Because, in El Carmen, the young animals are the ones that are mostly infected, these animals acquire early immunity, developing what is known as concomitant immunity [5,7] and for this reason, clinical cases are rare. In Quito, 30% belonged to the age group of 19 to 36 months that were positive for *Babesia* spp. These animals were of reproductive age and were inseminated for the first time. In Brazilian buffaloes, pregnant females had the highest infection rate, which was associated with hormonal and immunological changes [33]. The PCV analysis in all PCR positive animals in Quito was normal, excluding one with clinical finding. This is in agreement with what was found in Colombia, where the prevalence of *B. bigemina* and *B. bovis* was higher in animals with normal PCV values [34]. The breeds *Bos taurus* are associated with the presence of Babesiosis [2,31,35]. In the area of Manabí, the animals sampled were *Bos taurus* and *Bos indicus* crossbreeds, and in the area of Pichincha, they were *Bos taurus*, so that crossbreeding with *Bos taurus* in the study areas increases the probability of being infected by the *R. microplus* and therefore, of acquiring Babesiosis [2].

The phylogenetic analysis of *B. bovis* and *B. bigemina* in the two zones of Ecuador was grouped with sequences from other countries of South America, North America, Asia, Africa, and Oceania; this grouping has also been evidenced in isolates from the Brazilian Pantanal [35]. This suggests that most of the sequences found are not exclusive to Ecuador. This analysis also revealed four isolates of *B. bovis*: three isolates (EcuBbo 1, EcuBbo 2 and EcuBbo 3) in the area of El Carmen and two isolates (EcuBbo 2 and EcuBbo 4) in the area of Quito, showing that EcuBbo 2 is present in both areas, indicating that the parasites were transferred from the Ecuadorian coast to the temperate zone of the Sierra (i.e., Quito), possibly due to the mobility of animals. On the other hand, for *B. bigemina* in El Carmen, two isolates were determined (EcuBbi 1 and EcuBbi 2) and in the Quito area, only one isolate EcuBbi 3 was identified, none of which was similar between the

two zones. Thirty percent of the genetic diversity of *Babesia* spp. is associated with genetic differences between isolates in different geographic regions [36], but this diversity could also be associated with other factors such as the introduction of strains from different geographic locations, diversity of biological and mechanical vectors [7].

When observing the phylogenetic study carried out from the sequences downloaded from BLAST and comparing them to the 19 samples analyzed in this work, two large clades are observed, in the upper branches are the *B. bovis* and in the lower *B. bigemina*. Of the 19 samples evaluated in this study, we identified 7 different genotypes called EcuBbo1 to EcuBbo4 for those similar to *B. bovis* and EcuBbi1 to EcuBbi3 for those similar to *B. bigemina*.

For *B. bigemina*, the three genotypes are slightly different from each other and, in turn, similar to other genotypes described in Latin America and the world; for example, EcuBbi1 migrates very close to isolates from Puerto Rico, Virgin Island, Uruguay, etc. However, EcuBbi3 is similar to isolates from Cuba, Bolivia, and Argentina, but is closer to an isolate from India (see Figure 1).

On the other hand, when considering the genotypes similar to *B. bovis* identified as EcuBbo in this work, it can be highlighted that the similarity between them is much lower, finding that under the EcuBbo1 genotype, there are eight specimens identical to each other and all of them are from Carmen and equally similar to a Brazilian isolate. Four individuals conformed to the genotype identified as EcuBbo2 and all of them came from Quito (2469 m.a.s.l.). The EcuBbo3 isolate forms a unique genogroup that together with the two previous groups constitutes a single clade where sequences from Brazil, USA, and Turkey are found.

Very curiously, the EcuBbo4 group is constituted by three individuals, one comes from Carmen and the other two from Quito. This demonstrates the genetic closeness of both isolates, making clear the probability that the outbreak occurred in the bovines of Quito had its origin in babesiosis from the coastal region, in Ecuador itself.

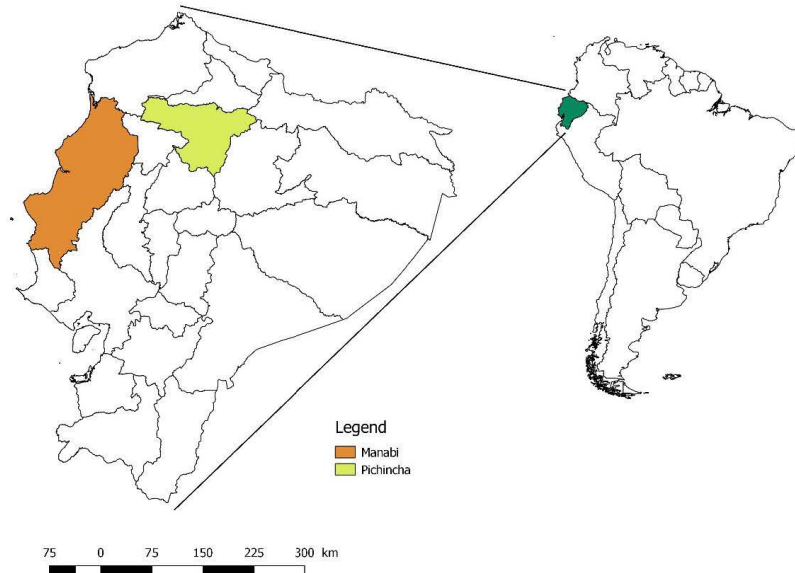
#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Study 1—Area of the Province of Manabí

Between March–April 2016, this study aimed to study bovine babesiosis in the parish of San Pedro de Suma the canton of El Carmen in the province of Manabí, in the coastal region of Ecuador, because this area concentrates 21.95% of the national bovine production [37] (Figure 2). The area belongs to the ecosystem: seasonal lowland evergreen forest of the Equatorial Chocó; with altitudes from 0 to 300 m.a.s.l., it has an infratropical thermotype and a humid bioclimate [15], with average temperatures of 27.2 °C (min 20.2 °C–max 34.4 °C), and average relative humidity of 79% (min 40%–max 92%) [38].

We collected blood samples from cattle ( $n = 264$ ) on twenty farms ( $n = 20$ ). Zootechnical information such as age and sex were collected from each animal. Age was distributed in four groups: 0 to 9 months, 10 to 18 months, 19 to 36 months, and older than 48 months.

For the sampling design, a database of the farms ( $n = 100$ ) existing in the parish of San Pedro de Suma from El Carmen, was obtained by interviewing the President of the Producers' Association. Depending on the number of existing cattle, the farms were categorized into: small (less than 20 cattle), medium (21 to 70 cattle), or large (more than 70 cattle). The sampled cattle came from small ( $n = 10$ ), medium ( $n = 6$ ), and large ( $n = 4$ ) farms, which were randomly selected from the database. The blood samples were obtained from a random sampling in a percentage depending on the category of the farm: small (minimum 50% of bovines), medium (minimum 25%), and large (minimum 13%), without the existence of exclusion variables.



**Figure 2.** Location of the provinces of Manabí and Pichincha in Ecuador.

#### 4.2. Study 2—Area of the Province of Pichincha

In May 2020, an outbreak of Babesiosis was reported in cattle on a farm in the parish of Conocoto (Canton Quito), 18 km from Quito, in the province of Pichincha in the Sierra Region (Figure 2). The area belongs to the evergreen montane shrubland ecosystem of the northern Andes. It corresponds to the Montane bioclimatic floor, with altitudes of 2000–3000 m.a.s.l. and a mesotropical thermotype; with a bioclimate as humid with an average relative humidity of 74% (min 27%–max 94%) [15] (Ecosystem Classification Systems of Continental Ecuador, 2013) and characterized by temperatures min 14 °C–max 21 °C [39]. The altitude of the farm is 2469 m.a.s.l.

We collected blood samples from cattle ( $n = 143$ ) of this outbreak, and zootechnical information such as age and sex were collected; furthermore, clinical parameters as PCV (packed cell volume) and rectal temperature were recorded in order to identify another possible sick animal.

#### 4.3. Collection and Analysis of Blood Samples

In the two study areas, blood samples in tubes without (VANTUBO®) and with anticoagulant (EDTA-K2 0.75 mm × 25 mm VACUTECH®) were collected from each animal by puncture of the coccygeal vein.

#### 4.4. Packed Cell Volume Determination

The packed cell volume value ( $\leq 24\%$  is related to anemia) [40] was determined from each blood sample (EDTA tube); for this, a fraction of blood was transferred to a capillary with heparin (TECNAN®) and centrifuged (TG12M Madell Technology Corporation, Riverside, CA, USA) at 10,000 rpm for 5 min and its reading was performed according to the usual procedures [40].

#### 4.5. DNA Extraction

DNA extraction from blood was performed following the protocol described by Tana-Hernandez et al., (2017) [41]. It was quantified by UV spectrophotometry in NanoDrop 2000 equipment (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), obtaining an average

concentration of 114.7 ng/mL, and DNA integrity was verified by electrophoresis in a 0.8% agarose gel.

#### 4.6. RFLP-PCR for the Detection of the 18s Fragment for *Babesia* spp.

For the detection of *Babesia*, a conventional PCR was performed using as specific primers: PIRO A (5'-AATACCCAATCCTGACACACAGGG-3') and PIRO B (5'-TTAAATACA CGAATGCCCCCAAC-3'), which partially amplify the 18s rRNA gene of *Babesia* spp. [42]; subsequently, the amplicons were cut with restriction enzymes, following the protocol described by Figueroa (2014) [43], using HpaII (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) to identify *B. bovis* and BoxI (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) for *B. bigemina*, according to the conditions of the commercial house.

PCR products from positive samples were purified using the Wizard® SV Gel and Clean-Up System (Promega, Wisconsin, Madison, WI, USA), and sent for sequencing to MACROGEN (Seoul, Korea).

#### 4.7. Analysis of the Sequence Obtained

In order to obtain the sequences to carry out the present work, one sample for each farm ( $n = 20$ ) (the most prominent amplicon on each farm) was sent three times to sequence, of which we only worked with those sequenced with higher quality indices of more than 90%. In the case of the Pichincha farm (outbreak), 17 samples were sequenced; all of them exceeded the required quality index.

These sequences were assembled using the Clustal W and BioEdit programs to obtain a consensus sequence for each of the samples. The consensus sequences were up-loaded to GenBank (Accession numbers: OL583933, OL583934, OL583935, OL583936, OL583937, OL583938, OL583939, OL583940, OL583941, OL583942, OL583943, OL583944, OL583945, OL583946, OL583947, OL583948, OL583949, OL583950, OL583951). Subsequently, the similarity and homology of the consensus sequences were evaluated with the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Evolutionary analyses were performed in MEGA X [44], using the maximum likelihood method and Tamura's 3-parameter model [23]. For this analysis, 34 partial 18s rRNA sequences of *B. bovis* and *B. bigemina* from Genbank and one sequence of *Plasmodium falciparum* as an outgroup were used.

#### 4.8. Statistical Analysis

Age and sex were the only two variables studied, and the significance of the difference in the distribution of the results was analyzed by the Fisher's Exact test, due to the low number of observations.

The PCV and the breed of the bovines were not analyzed as a possible explanatory factor, because in study 1 (El Carmen), complete information on these variables was not obtained, whereas in study 2 (Quito), complete information on these variables was obtained and the cattle had crosses with the Holstein, Brown Swiss, and Jersey breeds.

### 5. Conclusions

There is little information on the abundance and distribution of *R. microplus* in Ecuador. The presence of bovine Babesiosis in the area of Quito suggests that this tick can reach increasingly higher altitudes; this may be due to climatic factors, but also to the mobility of animals carrying ticks without any restriction or control.

This study evidenced for the first time the presence of *Babesia* spp. in the area of El Carmen located in the coastal region and in the area of Quito located in the highlands region. In addition, we found two circulating species *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle. *Babesia bovis* was the most predominant in both study zones; this species is associated with the outbreak reported in the Quito farm where symptomatic animals were found.

The sex of the cattle in both the El Carmen and Quito areas was not an explanatory factor. Age was an explanatory factor associated with the presence of Babesiosis in cattle in

Quito, in which symptomatology was evidenced. It is possible that Babesiosis is entering the area, while in El Carmen, it is likely that this parasite is in enzootic equilibrium.

This would be the first molecular characterization of *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle in two geographic zones of Ecuador, finding similarities in both zones, which would indicate that the hemotropics of the Quito zone come from the coastal region, possibly introduced due to animal mobility.

**Author Contributions:** C.S. and J.R.-R., funding acquisition and administration; A.R.-B. and C.S., supervision; M.A.C.-L., J.R.-R., and A.R.-B., conception and design of the study; M.A.C.-L., J.R.-R., G.G.-M., C.C.-I., V.M.-N. and M.Y.-D., executor of field survey; C.C.-I., V.M.-N., M.Y.-D. and A.R.-B., conducted the laboratory analyses; M.A.C.-L. and G.G.-M., data analysis; M.A.C.-L., C.C.-I. and S.M.-S., drafted the manuscript; A.R.-B., J.R.-R. and C.S., critical review & comments on draft. All authors contributed equally to this work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by the Academy of Research and Higher Education (ARES) through the project: “Establishment of a Platform to support training and awareness-raising, diagnosis and development of a control strategy for Brucellosis and Trypanosomiasis in Ecuador” (Bru-Tryp Project), with the participation of the University of Liège in Belgium and the Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE in Ecuador.

**Institutional Review Board Statement:** The president of the producers’ association of the San Pedro de Suma-Manabí parish, and the owner of the Quito farm authorized the collection of blood samples and application of diagnostic tests for bovine babesiosis.

**Informed Consent Statement:** The farmers were properly informed and gave their written consent prior to sampling their animals.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank all farmers who participated in the study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Martínez-García, G.; Santamaría-Espinosa, R.M.; Lira-Amaya, J.J.; Figueroa, J.V. Challenges in Tick-Borne Pathogen Detection: The Case for *Babesia* spp. Identification in the Tick Vector. *Pathogens* **2021**, *10*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bock, R.; Jackson, L.; De Vos, A.; Jorgensen, W. Babesiosis of Cattle. *Parasitology* **2004**, *129*, S247–S269. [[CrossRef](#)]
- Alvarez, J.A.; Rojas, C.; Figueroa, J.V. Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens* **2019**, *8*, 143. [[CrossRef](#)]
- Guglielmo, A.A. Epidemiology of Babesiosis and Anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* **1995**, *57*, 109–119. [[CrossRef](#)]
- Amorim, L.S.; Wenceslau, A.A.; Carvalho, F.S.; Carneiro, P.L.S.; Albuquerque, G.R. Bovine Babesiosis and Anaplasmosis Complex: Diagnosis and Evaluation of the Risk Factors from Bahia, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2014**, *23*, 328–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Assis Leite Souza, F.; de Siqueira Cajado Liarte, A.; de Carvalho Castro, K.N.; Beserra, E.E.A.; Bernardi, J.S.M.; de Sousa, G.V.; Costa-Júnior, L.M.; de Sousa Silva, S.M.M. Dynamics of Natural Infection by *Babesia Bovis* and *Babesia Bigemina* in Dairy Cattle from an Enzootic Instability Area in Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2018**, *27*, 2–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jaimés-Dueñez, J.; Triana-Chávez, O.; Holguín-Rocha, A.; Tobon-Castaño, A.; Mejía-Jaramillo, A.M. Molecular Surveillance and Phylogenetic Traits of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in Cattle (*Bos taurus*) and Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Colombia. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vieira, L.L.; Canevar, M.F.; Cardozo, L.L.; Cardoso, C.P.; Herkenhoff, M.E.; Neto, A.T.; Vogel, C.I.G.; Miletti, L.C. Prevalence of *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Cattle in the Campos de Lages Region, Santa Catarina State, Brazil, Estimated by Multiplex-PCR. *Parasite Epidemiol. Control* **2019**, *6*, e00114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Romero-Salas, D.; Mira, A.; Mosqueda, J.; García-Vázquez, Z.; Hidalgo-Ruiz, M.; Vela, N.A.O.; de León, A.A.P.; Florin-Christensen, M.; Schnittger, L. Molecular and Serological Detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-Infection in Bovines and Water Buffaloes Raised Jointly in an Endemic Field. *Vet. Parasitol.* **2016**, *217*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

10. Rashid, M.; Rashid, M.I.; Akbar, H.; Ahmad, L.; Hassan, M.A.; Ashraf, K.; Saeed, K.; Gharbi, M. A Systematic Review on Modelling Approaches for Economic Losses Studies Caused by Parasites and Their Associated Diseases in Cattle. *Parasitology* **2019**, *146*, 129–141. [[CrossRef](#)]
11. Gray, J.S.; Estrada-Peña, A.; Zintl, A. Vectors of Babesiosis. *Annu. Rev. Entomol.* **2019**, *64*, 149–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Grisi, L.; Leite, R.C.; de Souza Martins, J.R.; de Barros, A.T.M.; Andreotti, R.; Cançado, P.H.D.; de León, A.A.P.; Pereira, J.B.; Villela, H.S. Reassessment of the Potential Economic Impact of Cattle Parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2014**, *23*, 150–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Semenza, J.C.; Suk, J.E. Vector-Borne Diseases and Climate Change: A European Perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* **2018**, *365*, fnx244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Carrique Mas, J.J.; Widdowson, M.-A.; Cuéllar, A.M.; Ribera, H.; Walker, A.R. Risk of Babesiosis and Anaplasmosis in Different Ecological Zones of Santa Cruz Department, Bolivia. *Vet. Parasitol.* **2000**, *93*, 29–38. [[CrossRef](#)]
15. Ministerio del Ambiente del Ecuador. *Sistema de Clasificación de Ecosistemas del Ecuador Continental*; Subsecretaría de Patrimonio Natural Quito: Quito, Ecuador, 2013; Volume 1.
16. Maya-Delgado, A.; Madder, M.; Benítez-Ortiz, W.; Saegerman, C.; Berkvens, D.; Ron-Garrido, L. Molecular Screening of Cattle Ticks, Tick-Borne Pathogens and Amitraz Resistance in Ticks of Santo Domingo de Los Tsáchilas Province in Ecuador. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2020**, *11*, 8. [[CrossRef](#)]
17. Vasco Aguas, K.A.; Vasco, L. Estandarización de la Técnica de Análisis de Fusión de Alta Resolución Para la Detección de Babesia en Garrapatas Utilizando Polimorfismos de Nucleótidos. Tesis para la Obtención del Título en Medicina Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador, 2012.
18. Gioia, G.V.; Vinuesa, R.L.; Marsot, M.; Devillers, E.; Cruz, M.; Petit, E.; Boulouis, H.J.; Moutailler, S.; Monroy, F.; Coello, M.A.; et al. Bovine Anaplasmosis and Tick-Borne Pathogens in Cattle of the Galapagos Islands. *Transbound Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 1262–1271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Carret, C.; Walas, F.; Carcy, B. Babesia Canis Canis, Babesia Canis Voaeli, Babesia canis Rossi. *Society* **1999**, *46*, 298–303.
20. Medina-Naranjo, V.L.; Reyna-Bello, A.; Tavares-Marques, L.M.; Campos, A.M.; Ron-Román, J.W.; Moyano, J.C.; Jarrín-Porras, E.C.; Sandoval-Morejón, E.D.; Chávez-Larrea, M.A. Diagnóstico de Los Hemotrópicos *Anaplasma Marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. Mediante Las Técnicas de Elisai y PCR En Tres Fincas Ganaderas de La Provincia de Pastaza, Ecuador. *Rev. Cient. Fac. Cienc. Vet. Univ. Zulia* **2017**, *27*, 162–171.
21. Rodríguez-Hidalgo, R.; Pérez-Otáñez, X.; Garcés-Carrera, S.; Vanwambeke, S.O.; Madder, M.; Benítez-Ortiz, W. The Current Status of Resistance to Alpha-Cypermethrin, Ivermectin, and Amitraz of the Cattle Tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0174652. [[CrossRef](#)]
22. Tamura, K. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. *Mol. Biol. Evol.* **1992**, *9*, 678–687. [[CrossRef](#)]
23. Estrada-Peña, A.; Bouattour, A.; Camicas, J.-L.; Guglielmone, A.; Horak, I.; Jongejan, F.; Latif, A.; Pegram, R.; Walker, A.R. The Known Distribution and Ecological Preferences of the Tick Subgenus Boophilus (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Exp. Appl. Acarol.* **2006**, *38*, 219–235. [[CrossRef](#)]
24. Enríquez, S.; Guerrero, R.; Arrivillaga-Henríquez, J.; Araujo, P.; Villacrés, E.; Enríquez, A.; Benítez-Ortiz, W. New Records of Ticks of Genus *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) for Ecuador. *Acta Parasit.* **2020**, *65*, 430–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Benavides Ortiz, E. *Las Garrapatas del Ganado Bovino y los Agentes de Enfermedad que Transmiten en Escenarios Epidemiológicos de Cambio Climático: Guía Para el Manejo de Garrapatas Y Adaptación al Cambio Climático*; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Universidad de La Salle: San José, Costa Rica, 2016; ISBN 978-92-9248-655-6.
26. Léger, E.; Vourc'h, G.; Vial, L.; Chevillon, C.; McCoy, K.D. Changing Distributions of Ticks: Causes and Consequences. *Exp. Appl. Acarol.* **2013**, *59*, 219–244. [[CrossRef](#)]
27. Ogden, N.H.; Ben Beard, C.; Ginsberg, H.S.; Tsao, J.I. Possible Effects of Climate Change on Ixodid Ticks and the Pathogens They Transmit: Predictions and Observations. *J. Med. Entomol.* **2021**, *58*, 1536–1545. [[CrossRef](#)]
28. Acevedo-Gutiérrez, L.Y.; Paternina, L.E.; Londoño, A.F.; Parra-Henao, G.; Rodas, J.D. Modelos potenciales de distribución geográfica y climática del complejo *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), potencial vector de *Rickettsia rickettsii* en Colombia. *Biomedica* **2018**, *38*. [[CrossRef](#)]
29. Durden, L.A.; Keirans, J.E. Description of the Larva, Diagnosis of the Nymph and Female Based on Scanning Electron Microscopy, Hosts, and Distribution of *Ixodes* (*Ixodes*) *venezuelensis*. *Med. Vet. Entomol.* **1994**, *8*, 310–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Yang, X.; Gao, Z.; Wang, L.; Xiao, L.; Dong, N.; Wu, H.; Li, S. Projecting the Potential Distribution of Ticks in China under Climate and Land Use Change. *Int. J. Parasitol.* **2021**, *51*, 749–759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Chauvin, A.; Moreau, E.; Bonnet, S.; Plantard, O.; Malandrin, L. Babesia and Its Hosts: Adaptation to Long-Lasting Interactions as a Way to Achieve Efficient Transmission. *Vet. Res.* **2009**, *40*, 37. [[CrossRef](#)]
32. Suarez, C.E.; Noh, S. Emerging Perspectives in the Research of Bovine Babesiosis and Anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* **2011**, *180*, 109–125. [[CrossRef](#)]
33. da Silva, J.B.; André, M.R.; da Fonseca, A.H.; de Albuquerque Lopes, C.T.; da Silva Lima, D.H.; de Andrade, S.J.T.; Oliveira, C.M.C.; Barbosa, J.D. Molecular and Serological Prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in Water Buffaloes in the North Region of Brazil. *Vet. Parasitol.* **2013**, *197*, 678–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Jaimes-Dueñez, J.; Triana-Chávez, O.; Mejía-Jaramillo, A.M. Parasitological and Molecular Surveys Reveal High Rates of Infection with Vector-Borne Pathogens and Clinical Anemia Signs Associated with Infection in Cattle from Two Important Livestock Areas in Colombia. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2017**, *8*, 290–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mendes, N.S.; de Souza Ramos, I.A.; Herrera, H.M.; Campos, J.B.V.; de Almeida Alves, J.V.; de Macedo, G.C.; Machado, R.Z.; André, M.R. Genetic Diversity of *Babesia bovis* in Beef Cattle in a Large Wetland in Brazil. *Parasitol. Res.* **2019**, *118*, 2027–2040. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Flores, D.A.; Minichiello, Y.; Araujo, F.R.; Shkap, V.; Benítez, D.; Echaide, I.; Rolls, P.; Mosqueda, J.; Pacheco, G.M.; Petterson, M.; et al. Evidence for Extensive Genetic Diversity and Substructuring of the *Babesia Bovis* Metapopulation. *Transbound. Emerg. Dis.* **2013**, *60*, 131–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Instituto Nacional de Estadística y Censo. *Agricultura, Silvicultura y Pesca*; ES: Quito, Ecuador, 2020.
38. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología INAMHI. *Boletín Climatológico Semestral 2016*; ES: Quito, Ecuador, 2016; p. 22.
39. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología INAMHI. *Boletín Climático Mensual*; ES: Quito, Ecuador, 2021; p. 6.
40. Rockett, J.; Bosted, S. *Veterinary Clinical Procedures in Large Animal Practice*. Bosted, S., Ed.; Thompson-Delmar Learning: Boston, MA, USA, 2007; ISBN 978-1-4018-5787-5.
41. Tana-Hernández, L.; Navarrete-Arroyo, K.; Ron-Román, J.; Reyna-Bello, A.; Chávez-Larrea, M.A. PCR-Diagnosis of *Anaplasma marginale* in Cattle Populations of Ecuador and Its Molecular Identification through Sequencing of Ribosomal 16S Fragments. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Carret, C.; Delbecq, S.; Labesse, G.; Carcy, B.; Precigout, E.; Moubri, K.; Schetters, T.P.M.; Gorenflot, A. Characterization and Molecular Cloning of an Adenosine Kinase from *Babesia canis rossii*: Molecular Cloning of a *B. canis rossii* Adenosine Kinase. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *265*, 1015–1021. [[CrossRef](#)]
43. Figueroa, J.V. Optimización de una prueba de pcr-rflp para detección y diferenciación de *Babesia* sp. en garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Entomol. Vet.* **2014**, *1*, 978–983.
44. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

---

## Section expérimentale

### **Etude 4 :**

**Molecular identification of *Trypanosoma theileri* (Laveran, 1902) in cattle from two slaughterhouses in Ecuador and its relation with other haemotropic agents**

---

*Front. Vet. Sci. 10:1153069*

María Augusta Chávez-Larrea, Cristina Cholota-Iza, Jorge Cueva-Villavicencio, Michelle Yugcha-Díaz, Jorge Washington Ron-Román, Andrea Rodríguez-Cabezas, Claude Saegerman and Armando Reyna-Bello

## *Préambule*

Bien que *T. theileri* soit traditionnellement considéré comme un parasite faiblement pathogène chez le bétail, des recherches récentes indiquent qu'il pourrait être lié à des maladies subcliniques ou affecter des animaux dont le système immunitaire est affaibli. De plus, *T. theileri* peut coexister avec d'autres agents pathogènes, ce qui pourrait compliquer le diagnostic et la gestion de diverses maladies. Cette thèse aborde l'étude de ce parasite en raison de l'importance de surveiller les infections parasitaires, même celles considérées comme inoffensives. Une connaissance plus approfondie de *T. theileri* pourrait contribuer à améliorer les pratiques de gestion, de prévention et de contrôle dans les élevages, et fournir des informations précieuses sur les mécanismes d'évasion immunitaire, utiles dans les recherches futures sur les vaccins et les traitements.

Dans la présente étude, la stratégie choisie pour l'identification de *T. theileri* et d'autres agents hémotropes en Equateur a été l'inspection dans des abattoirs, puisque ces installations reçoivent des animaux de plusieurs régions du pays. Deux abattoirs ont été choisis : l'un à Quito (région de la Sierra), qui est le plus grand du pays, et l'autre à Santo Domingo de los Tsáchilas (région côtière) parce que cette ville accueille la plus grande foire du bétail du pays.

Pour cette étude, des techniques moléculaires telles que la PCR de type *CatL* ont été utilisées pour la détection de *T. theileri* et *T. vivax*, ainsi que la PCR *msp5*, la PCR *RAP-1* et la PCR *hyp* et PCR *ESAG* pour le diagnostic d'*A. marginale*, *B. bovis* et *B. bigemina* et *T. evansi* respectivement. Pour *T. theileri*, une PCR nichée ciblant le gène *18S ITS* a été utilisée. Les échantillons positifs pour *T. theileri* ont été analysés à l'aide d'une PCR nichée basée sur la région de l'espace transcrit interne (ITS) ; ce marqueur génétique a été utilisé pour distinguer les lignées et les phénotypes de *T. theileri*.

Au total, 34 des 218 échantillons, soit 15,6 %, étaient positifs pour *T. theileri*. Deux nouveaux isolats équatoriaux de *T. theileri*, ThI (n=7/13) et ThII (n=6/13) ont été identifiés selon l'arbre phylogénétique. La co-infection était évidente dans 31/34 échantillons avec d'autres agents hémotropes: *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp et *T. vivax*. Aucun échantillon n'était positif pour *T. evansi*.



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
 Mohamed Samir,  
 The Pirbright Institute, United Kingdom

REVIEWED BY  
 Alireza Sazmand,  
 Bu-Ali Sina University, Iran  
 Ewan MacLeod,  
 University of Edinburgh, United Kingdom

\*CORRESPONDENCE  
 Armando Reyna-Bello  
 ✉ aareyna@espe.edu.ec

RECEIVED 28 January 2023  
 ACCEPTED 30 May 2023  
 PUBLISHED 23 June 2023

CITATION  
 Chávez-Larrea MA, Cholota-Iza C,  
 Cueva-Villavicencio J, Yugcha-Díaz M,  
 Ron-Román JW, Rodríguez-Cabezas A,  
 Saegerman C and Reyna-Bello A (2023)  
 Molecular identification of *Trypanosoma*  
*theileri* (Laveran, 1902) in cattle from two  
 slaughterhouses in Ecuador and its relation  
 with other haemotropic agents.  
*Front. Vet. Sci.* 10:1153069.  
 doi: 10.3389/fvets.2023.1153069

## COPYRIGHT

© 2023 Chávez-Larrea, Cholota-Iza,  
 Cueva-Villavicencio, Yugcha-Díaz, Ron-Román,  
 Rodríguez-Cabezas, Saegerman and  
 Reyna-Bello. This is an open-access article  
 distributed under the terms of the [Creative  
 Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,  
 distribution or reproduction in other forums is  
 permitted, provided the original author(s) and  
 the copyright owner(s) are credited and that  
 the original publication in this journal is cited, in  
 accordance with accepted academic practice.  
 No use, distribution or reproduction is  
 permitted which does not comply with these  
 terms.

# Molecular identification of *Trypanosoma theileri* (Laveran, 1902) in cattle from two slaughterhouses in Ecuador and its relation with other haemotropic agents

María Augusta Chávez-Larrea<sup>1,2</sup>, Cristina Cholota-Iza<sup>2</sup>,  
 Jorge Cueva-Villavicencio<sup>2</sup>, Michelle Yugcha-Díaz<sup>2</sup>,  
 Jorge Washington Ron-Román<sup>3</sup>, Andrea Rodríguez-Cabezas<sup>2</sup>,  
 Claude Saegerman<sup>1</sup> and Armando Reyna-Bello<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULiège), Department of Infections and Parasitic Diseases, Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium, <sup>2</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador, <sup>3</sup>Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador

*Trypanosoma theileri* is a worldwide distributed haemoparasite that has been reported throughout the American continent in various species, including bovines, buffaloes and bats. In bovines, high incidence of *T. theileri* can be harmful when associated with other infections or under stress situations. There is little information on this hemoflagellate in Ecuador, which prompted the study and molecular identification of the trypanosomes collected in two slaughtering centers. Between February and April 2021, a total of 218 samples of bovine blood were collected in abattoirs located in the Andean region of Quito ( $n = 83$ ) and in the coastal region, in Santo Domingo ( $n = 135$ ). Quito public Slaughterhouse is the biggest in Ecuador, and for that, they receive animals from all country; on the other hand, Santo Domingo's Slaughterhouse is a small one where mainly females from the region are sacrificed and some males. The samples were evaluated using two molecular tests, the PCR cathepsin L-like (CatL) specific for *T. theileri* and for the positive samples, a Nested PCR that targets the ITS of the 18S gene. The corresponding PCR products were sequenced, analyzed by BLAST/NCBI and the sequences were used to build a concatenated phylogenetic tree, using the MEGA XI software. Overall, 34 out of the 218 samples, (15.6%) were positive to *T. theileri* by PCR CatL, resulting from 20/83 (24.1%) positives from the Quito abattoir and 14/135 (10.4%) from the Santo Domingo slaughterhouse. These prevalence rates were found to be significantly different ( $p = 0.006$ ). According to the phylogenetic tree based on the CatL and ITS concatenated sequences ( $n = 13$ ), the two novel Equatorial *T. theileri* isolates, ThI ( $n = 7$ ) and ThII ( $n = 6$ ) are closely related and associated to the IC, IB and IIB genotypes, present in Brazil, Venezuela and Colombia. Thirty-one out of the thirty-four *T. theileri*-positive bovines were co-infected with other haemotropic pathogens, *Anaplasma marginale* *Babesia* spp

and *T. vivax*. This coinfection could be responsible for additional pathologies and harmful effects on the affected cattle. This study presents the molecular identification and genotyping of *T. theileri* isolated from cattle in Ecuador through the analysis of *CATL* and *ITS* sequences, and the high frequency of coinfection of this hemoflagellate with other blood haematropic organisms.

## KEYWORDS

bovine trypanosomosis, *Trypanosoma theileri*, lineage (ThI-Th-II), cattle, Ecuador, *Anaplasma marginale*, *Babesia*, *Trypanosoma vivax*

## 1. Introduction

In Ecuador, livestock production represents an important component of its economy with a 7.7% contribution to the Gross Domestic Product (GDP), and an estimated bovine population of 4.34 million that is distributed in four regions: 41.24% in the Coast region, 46.11% in the Mountain range (Andes), 9.65% in the Amazon and 0.43% in the Insular or Galapagos region (1). The division of Ecuador in four natural regions, coastal, Andes, Amazon (2) and Insular (Galapagos Islands) influences the distribution and management of various bovine breeds, as well as disease prevalence and disease risk factors (3).

Bovine trypanosomosis is a hemoparasitic disease distributed throughout parts of the African and American continents. In Latin-America, *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma theileri* are the main trypanosome species that affect bovines (4). *T. theileri* is the least studied since it has been considered a nonpathogenic parasite (5). However, some recent studies show that *T. theileri* is an opportunistic parasite that can cause anemia, fever, swollen lymph nodes and lower hemoglobin concentration (6, 7).

*Trypanosoma theileri* has been classified within the Megatrypanum subgenera. It is larger than *T. evansi* and *T. vivax*, reaching a length between 69 to 109  $\mu\text{m}$  it. This parasite has a free flagellum, with a well-developed undulating membrane and its posterior part is conical (4). The sequencing and subsequent transcriptome of *T. theileri* has revealed greater proximity to *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*, in the Stercoraria clade, as compared to *T. brucei* and *T. vivax*, which belong to the Salivarian clade. Like other trypanosomes, *T. theileri* persists in the host for a long time due to an efficient evasion mechanism that involves the synthesis of five diverse families of GPI-anchored surface proteins with conserved N- and C-terminal and over 1,000 genes that encode surface proteins distinct from the Variable Surface Glycoprotein (VSG) characteristic of the Salivarian group (8).

*T. theileri* has a cosmopolitan distribution throughout the world from Asia to America (5), infecting different species of the Order Artiodactyl, especially cattle and buffaloes (9). In Colombia, a northern neighbor country to Ecuador, the reported prevalence values for *T. theileri* appear to be higher in cattle (38.6 and 50.9%) than in buffaloes (28.2%) (9, 10). Lower prevalence values have been reported by Pacheco et al. (11), using a PCR based on Cathepsin L-like gene (PCR-ThCATL) in Brazil, with prevalence values of 42.19% per farm and 12.19% per animal.

The transmission of *T. theileri* can occur cyclically, mainly by horseflies, where the infective form is found in the intestine. This hemoflagellate like others within the Stercoraria group, is transmitted to the vertebrate host through contamination of wounds caused by horsefly bites (4, 10). Studies in Poland and Germany showed that 33.68 and 39% of *T. theileri* infected horseflies, respectively (12, 13). In Brazil, the reported prevalence of *T. theileri* in horseflies was 40 and 70% in two different geographical areas. In Ecuador there are few studies concerning tabanid fauna, however, in 2009 Cárdenas et al. (14) revealed a high density and species diversity for the country. In addition, iatrogenic and mechanical transmission by *Phlebotomus* (10, 15) and *Aedes* mosquitoes has also been reported (16).

The presence of trypanosomosis represents a limiting factor for livestock productivity due to economic losses attributed mainly to low milk production (17).

Despite this, there is little information on bovine trypanosomosis in Ecuador; however, Coello Peralta et al. found 20% positive samples of *Trypanosoma* spp. in sheep blood smears (18). Other studies by Medina-Naranjo et al. found a seroprevalence of 31.3% for *Trypanosoma* spp. using ELISA in the province of Pastaza (Amazon region) (19). In 2020 the first report of *T. vivax* was made in an outbreak in cattle in the Canton El Carmen, in the Manabí province, in the coastal region (20), and, regarding *T. theileri*, this hemoflagellate was recently described in the Ecuadorian Amazon region, with a prevalence of 11.4% (21).

Other homeotropic agents have also been reported in Ecuador; *A. marginale* was first described in the Santo Domingo Province after analysis by PCR of 151 blood samples, which resulted in a high, 86.1% rate of rickettsia infection (22). In Zamora-Chinchipe (South-Eastern Ecuador, close to Peru), a 68.8% prevalence was reported, indicating the widespread distribution and genetic variability of this bacterial pathogen in the country (21%) (23).

Even in the Galapagos Islands, this Rickettsia has been described, with a prevalence higher than 90%, which indicates the endemic nature of anaplasmosis in the islands (24). Regarding bovine babesiosis, Chávez-Larrea et al. (25) determined the presence of *Babesia* spp. by PCR in 18.94% (14.77% *Babesia bovis* and 4.17% *Babesia bigemina*) of twenty farms around El Carmen at 300 m.a.s.l.. Curiously, in this study, they found a prevalence of 20.28% (14.69% *B. bovis* and 5.59% *B. bigemina*) in Quito at 2469 m. a. s. l., demonstrating the adaptation of the vectors at higher altitudes (25).

The identification of the *Trypanosoma* species and its relationship with other haematropic that are present in Ecuador,

their distribution and prevalence are important aspects to clarify their epidemiology and to set the basis to implement timely and adequate diagnostic protocols and treatments. Similar studies led to the description of a novel trypanosome species, *Trypanosoma (Megatrypanum) trinaperronei* n. sp. in the white-tailed deer in Venezuela (26). For this reason, the present study focused, on the molecular identification of *T. theileri* in cattle originating in two slaughterhouses from the Pichincha and Santo Domingo de los Tsáchilas provinces and its relationship with other haemotropic.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Context of the study

To study the presence of *Trypanosoma theileri* in Ecuador, blood specimens were collected in the Quito and Santo Domingo slaughterhouses (Figure 1). Three interventions were done in the Quito slaughterhouses between February and March 2020, while four interventions were performed in the Santo Domingo abattoir between March and April 2021.

The Quito slaughterhouse is located in the capital city of Quito, in the Pichincha province, belonging to the Sierra (Andes) region, at 2.850 m above sea level. The Santo Domingo slaughterhouse is in the Santo Domingo de los Tsáchilas province, 133 km from the city of Quito, at 655 m above sea level, in the Coastal zone (Figure 1).

### 2.2. Sampling and conservation of bovine blood samples

A total of 218 cattle were sampled, including two species: *Bos indicus* and *Bos taurus*. In the slaughterhouses of Quito,  $n = 83$ , and Santo Domingo,  $n = 135$ . Blood samples were collected in 10 mL tubes with EDTA from the jugular vein at the time of the sacrifice of the animals. Depending on the number of animals slaughtered in the Quito slaughterhouse (27), one out of 10 animals was selected for each intervention. Given the low number of animals slaughtered daily, one out of every two animals was sampled for each intervention in the Santo Domingo slaughterhouse.

The Quito slaughterhouse is one of the largest in Ecuador, where many male and female animals are slaughtered. On the other hand, the Santo Domingo slaughterhouse is small, where mainly females from surrounding areas are killed. The males in the area are transferred to the slaughterhouse in Quito or another private.

Samples were temporarily stored at room temperature while transferred to the laboratory and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  at the Animal Biotechnology Laboratory of the Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE and assigned identification numbers with information on sex and breed.

### 2.3. Packed cell volume and hematocrit concentration technique

The PCV value of the blood samples was determined using capillary tubes with heparin (TECNAN, Navarra, Spain). The tubes were centrifuged (TG12M Madell Technology Corporation,

Riverside, California, USA) at 12,000 rpm for 5 min. To evidence the parasite in the blood, within the first 4 h of sample collection, the heparinized capillary tubes were observed under a microscope (KRUSS, Hamburg, Germany) according to the HCT technique (28).

### 2.4. DNA extraction

Deoxyribonucleic Acid (DNA) extraction from blood samples was performed using the GeneJet Whole Blood Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). The DNA integrity was verified on a 0.8% agarose gel and DNA concentration was quantified by UV spectrophotometry, using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

### 2.5. Molecular diagnosis

Several primer sets were used to diagnose haemotropic pathogens (Table 1) and all PCR reactions were carried out in 25  $\mu\text{L}$  reaction volumes, using the Proflex Thermal Cycler (Life Technologies, Carlsbad, California, U.S.A.). The positive controls for *T. theileri* were the samples that tested positive for HCT. On the other hand, for *Babesia*, *T. vivax*, and *A. marginale*, previously prepared plasmids were used (29–31).

### 2.6. Detection of *T. theileri*

A specific catalytic domain of cathepsin L-like (*CATL*-like) PCR, that amplified a partial sequence of the *CATL* gene (29), was performed to detect the presence of *T. theileri*, using between 100 and 150 ng of DNA, as modified by Yokoyama et al. (36). Samples that were positive for the *CATL*-like PCR were analyzed with a Nested PCR based on the internal transcribed spacers (*ITS*) region, as described by Cox et al. (31), except for the temperature of annealing which was increased  $59^{\circ}\text{C}$  to improve specificity. This genetic marker was used to distinguish the *T. theileri* lineages and phenotypes. The first-round reaction mixture for the nested PCR contained 100–150 ng of DNA and the external primers ITS1 and ITS2, while the second round used 1  $\mu\text{L}$  of the PCR product from the first reaction and the ITS3 and ITS4 internal primers (Table 1).

### 2.7. Detection of coinfection with other haemotropic agents

All positive samples for the *CATL*-like PCR were further analyzed with different PCR assays to determine coinfection. For *T. vivax*, a specific *CATL*-like PCR was performed (20, 30), for *T. evansi*, the ESAG primer set was used (32), for *A. marginale* the *msp5* PCR was utilized (22, 33), while *B. bovis* and *B. bigemina* were diagnosed by *RAP-1* PCR and *HYP* PCR, respectively (34, 35).

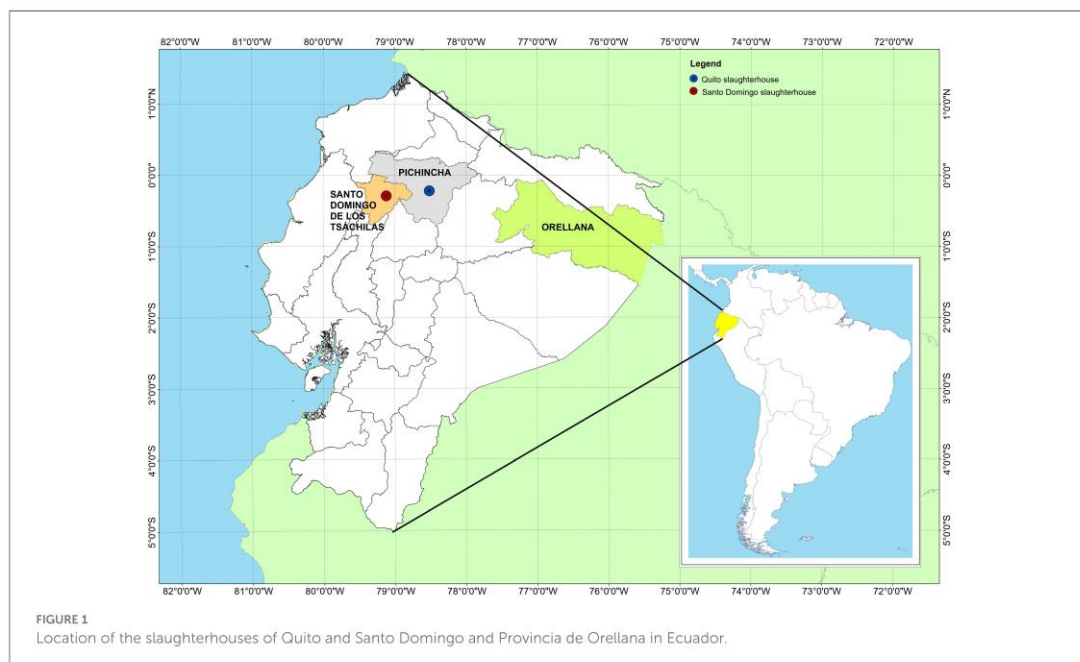


FIGURE 1 Location of the slaughterhouses of Quito and Santo Domingo and Provincia de Orellana in Ecuador.

TABLE 1 List of primers used for molecular analysis by PCR for the detection of haemoparasites in cattle.

Haemoparasites	Target gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5' -3')	Reference
<i>T. theileri</i>	CATL	TthCATL1	CGTCTCGGCTCCGGTCAAAC	(29)
		DT0155	TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA	(30)
	ITS	ITS1	GAT TAC GTC CCT GCC ATT TG	(31)
		ITS2	TTG TTC GCT ATC GGT CTT CC	
		ITS3	GGA AGC AAA AGT CGT AAC AAG G	
ITS4	TGT TTT CTT TTC CTC CGC TG			
<i>T. vivax</i>	CATL	TwiCatL1	GCCATCGCCAAGTACCTCGCGGA	(30)
		DT0155	TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA	
<i>T. evansi</i>	ESAG	ESAG6	ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG	(32)
		ESAG7	CACGTGAATCCTCAATTTTGT	
<i>A. marginale</i>	msp5	19A	GTGTTCTCGGGTACTCCTA	(22, 33)
		19B	TGATCTGGTCAGCCCCAGCT	
<i>B. bovis</i>	RAP-1	BoF	CACGAGGAAGGAACCTACCGATGTTGA	(34)
		BoR	CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA	
<i>B. bigemina</i>	HYP	BiIA	CATCTAATTCTCTCCATACCCCTCC	(35)
		BiIB	CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAG	

### 2.8. Phylogenetic analysis

Positive PCR products for *CATL*-like PCR specific for *T. theileri* and positive PCR products for ITSs Nested PCR, were sequenced in (Macrogen, Seoul, Korea), using the Sanger technique. The consensus sequences were deposited in GenBank (Accession

numbers for *CATL*-like: OQ304106, OQ304107, OQ304108, OQ304109, OQ304110, OQ304111, OQ304112, OQ304113, OQ304114, OQ304115, OQ304116, OQ304117, OQ304118 and Accession numbers for ITS: OQ341204, OQ341205, OQ341206, OQ341207, OQ341208, OQ341209, OQ341210, OQ341211, OQ341212, OQ341213, OQ341214, OQ341215, OQ3412166).

The similarity of the consensus sequences obtained for both the *CATL*-like and the *ITS* were analyzed with the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool the National Center for Biotechnology Information). Phylogenetic relationships were based on the sequences obtained in this study and on previously described sequences available in the GenBank database (9, 30, 37). The construction of a Maximum Likelihood tree, Tamura-Nei model (38) was carried out using the MEGAXI program.

## 2.9. Epidemiological and statistical analysis

A Microsoft Excel sheet was used to organize, clean, and validate the laboratory results. Significant differences in the distribution of *T. theileri* lineages and biotypes between the two abattoirs, between individuals of different sex and animal breeds, were analyzed by the Fisher's exact test, a statistical test used to determine nonrandom associations between a small group of observations. Bovine origin was excluded in the analysis of the Santo Domingo abattoir, since that information was not considered reliable.

## 3. Results

Out of the 218 analyzed samples, 38.1% were collected in the Quito slaughterhouse, while the remaining 62% were from the Santo Domingo slaughterhouse. Regarding the origin of the animals, we relied only on the information collected in the Quito slaughterhouse, where 11/83 (13.3%) of the animals originated in the Santo Domingo Province, 13/83 (15.7%) in the Orellana province, and 59/83 (71.1%) with unknown provenance. The results of the diagnostic tests regarding the sex variable, were only analyzed for the Quito slaughterhouse, where the sampling included similar percentages of males (44.6%) and females (55.4%). By contrast, an unintentional bias was introduced in the sampling of slaughter groups at the Santo Domingo abattoir, with a very low percentage of males (3%), as compared to females (97%).

From the 218 total bovine samples, 13 (6.0%) were positive with *Trypanosoma* spp. by the HCT technique, corresponding to a significant difference ( $p < 0.05$ ) in the prevalence (14.5%) in the Quito abattoir, as compared to the prevalence (0.74%) in the Santo Domingo slaughterhouse. The average values of the packed cell volume (PCV) for the tested animals and those positive to *T. theileri* were 37.7 and 38.42%, with standard deviations of 10.0 and 7.6%, respectively.

The *CATL*-like PCR test identified 34 samples positive to *T. theileri* (15.6%), 20 (24.1%) originating in the Quito abattoir and 14 (10.4%) in the Santo Domingo slaughterhouse, with a significant difference between these locations ( $p = 0.006$ ). Among the 20 samples that were positive by *CATL*-like PCR in the Quito abattoir, there were 10 males (27.0%) and 10 females (21.7%), which resulted in no significant difference in the sex variable ( $p > 0.05$ ). In the Quito abattoir, no statistically significant differences were found among the bovines positive to *T. theileri* and the two species that were examined, *Bos indicus* and *Bos taurus*.

The use of the *CATL*-like PCR showed that 7 of the 13 HCT-positive bovines, corresponded to *T. theileri* infections and 5 to *T.*

*vivax* infections. Through the use of molecular tests, the prevalence of five haematropic agents was obtained: *T. theileri* (15.6%), *T. vivax* (7.3%), *A. marginale* (60.1%), *B. bovis* (3.2%) and *B. bigemina* (2.3%). No animals were positive to *T. evansi*, using the ESAG PCR. Table 2 presents distribution details of the positive cases of the various haemopathogens that were analyzed, regarding the two abattoirs, sex and species of the sampled individuals.

All the *T. theileri* positive bovines ( $n = 20$ ) in the Quito slaughterhouse were coinfecting, 15 (18.1%) with *A. marginale* and 5 (6.0%) with *T. vivax* and *A. marginale*. With regard to the Santo Domingo slaughterhouse 11 of the 14 bovine samples that were positive to *T. theileri* showed coinfection; 6 (4.4%) with *A. marginale*, 2 (1.5%) with *T. vivax* and 3 (2.2%) with *T. vivax* and *A. marginale* (Table 3).

The phylogenetic tree constructed from the 13 best quality sequences (Figure 2) of the *CATL*-like and *ITS* PCR amplicons ( $n = 24$ ), showed that the *T. theileri* isolates cluster within the ThI ( $n = 7$ ) and ThII ( $n = 6$ ) lineages. In the Quito slaughterhouse, two samples belong to the IB genotype and three to the IC genotype, within the ThI lineage, while five samples belonged to the IIB genotype in the ThII lineage. On the other hand, in the Santo Domingo slaughterhouse, two samples aligned with genotype IC of the ThI lineage, and one sample with the IIB genotype of the ThII lineage. The phylogeographic tree (Figure 2) showed that seven of the isolates, from Quito ( $n = 5$ ) and Santo Domingo ( $n = 2$ ), clustered within the Brazil clades; while the 6 remaining isolates, from Quito ( $n = 5$ ) and Santo Domingo ( $n = 1$ ), clustered with the Venezuelan and Colombia clades.

Out of the 13 samples that were analyzed for lineages and genotypes, 12 showed coinfection with *T. vivax* and/or *A. marginale*. Further details of the lineages-biotypes and coinfection with *T. vivax*, *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* are presented in Table 3.

As for the origin of the animals from the Quito slaughterhouse, it was possible to determine that ThI-IB ( $n = 2$ ) and ThI-IC ( $n = 2$ ) originated from the province of Santo Domingo de los Tsáchilas, while the animals with the genotype ThII-IIB ( $n = 5$ ) originated from the province of Orellana.

## 4. Discussion

This study evidenced the presence of *T. theileri* in bovines from two slaughterhouses in Ecuador, using a molecular test (*CATL*-like PCR). Significant prevalence values of 24.1 and 10.4% for *T. theileri* were determined for the Quito and the Santo Domingo abattoirs, located in the Andean and Coastal regions, respectively.

Prevalence values for *T. theileri* in South America are high, suggesting that this parasite is widely distributed in the cattle production systems in this region. The global prevalence values (15.6%) determined in the present study is congruent with reports from some farms in neighboring countries, including 5.0 and 30.4% in Venezuela and Brazil, respectively (39), 8.1% in Brazil (11), and 38.6 to 50.3% in Colombia (6, 9). The high prevalence values for *T. theileri* in other countries have been related to environmental conditions, host, and parasite factors (9). This report of the presence of *T. theileri* in cattle in Ecuador highlights the importance of these neglected diseases and the need to focus more attention and

TABLE 2 Distribution of positive cases for *T. theileri* and other haemopathogens in the slaughterhouses of Quito and Santo Domingo.

Parameter	Total number of animals (%)	Positive HCT		Positive <i>T. theileri</i>		Positive <i>T. vivax</i>		Positive <i>A. marginale</i>		Positive <i>B. bovis</i>		Positive <i>B. bigemina</i>	
		No	95 % (IC)	PCR CATL -like		PCR CATL -like		PCR <i>Msp5</i>		PCR <i>RAP-1</i>		PCR <i>HYP</i>	
				N°	95 % (IC)	N°	95 % (IC)	N°	95 % (IC)	N°	95 % (IC)	N°	95 % (IC)
Quito	83 (38.1)	12	14.5 (6.9-22.0)	20	24.1 (15.4-34.7)	11	13.3 (6-20.6)	61	73.5 (64.0-83)	4	4.8 (0.2-9.4)	3	3.6 (0.8-10.2)
<b>Sex</b>													
Male	37 (44.6)	5	13.5 (2.5-24.5)	10	27.0 (12.7-41.3)	5	13.5 (2.5-24.5)	24	64.9 (49.5-80.3)	0	0.0	0	0.0
Female	46 (55.4)	7	15.2 (4.8-25.6)	10	21.7 (9.8-33.7)	6	13.0 (3.3-22.9)	37	80.4 (69.0-91.9)	4	8.7 (0.6-16.8)	3	6.5 (1.4-17.9)
<b>Species</b>													
Bt + Bi	21 (25.3)	2	9.5 (1.2-30.4)	5	23.8 (5.6-42.03)	1	4.8 (0.1-23.8)	15	71.4 (52.1-90.8)	1	4.8 (0.1-23.8)	0	0.0
Bt	52 (62.7)	8	15.4 (5.6-25.2)	13	25.00 (13.2-36.7)	9	17.3 (7.0-27.6)	37	71.2 (58.8-83.5)	3	5.8 (1.2-16.0)	3	5.8 (1.2-16.0)
Bi	10 (12.1)	2	20.0 (2.5-55.6)	2	20.0 (2.5-55.6)	1	10 (0.3-44.5)	9	90 (71.4-100.0)	0	0.0	0	0.0
Santo Domingo	135 (61.9)	1	0.7 (0.02-4.1)	14	10.4 (5.8-16.8)	5	3.7 (0.5-6.8)	70	51.9 (43.4-60.3)	3	2.2 (0.5-6.4)	2	1.5 (0.2-5.2)
<b>Sex</b>													
Male	131 (97.1)	1	0.8 (0.02-4.2)	13	9.9 (4.8-15.0)	4	3.1 (0.1-6.0)	66	50.4 (41.9-58.9)	3	2.3 (0.5-6.5)	2	1.5 (0.2-5.4)
Female	4 (3.0)	0	0.0	1	25 (0.6-80.6)	1	25 (0.6-80.6)	4	100	0	0.0	0	0.0
<b>Species</b>													
Bt + Bi	68 (50.4)	0	0.0	6	8.8 (2.1-15.6)	2	2.9 (0.4-10.2)	34	50 (38.1-61.9)	3	4.4 (0.9-12.4)	2	2.9 (0.4-10.2)
Bt	52 (38.52)	0	0.0	6	11.5 (2.9-20.2)	2	3.9 (0.5-13.2)	30	57.7 (44.3-71.1)	0	0.0	0	0.0
Bi	15 (11.1)	1	6.7 (0.2-32.0)	2	13.3 (1.7-40.5)	1	6.7 (0.2-32.0)	6	40 (15.2-64.8)	0	0.0	0	0.0
TOTAL	218	13	6 (3.2-10.0)	34	15.6 (11.1-21.11)	16	7.3 (3.9-10.8)	131	60.1 (53.6-66.6)	7	3.2 (0.9-5.6)	5	2.3 (0.3-4.3)

Bt, Bos Taurus; Bi, Bos indicus; IC, confidence interval. The bold values indicate the total numbers of each slaughterhouse and the totals of the sampling.

TABLE 3 Details of *T. theileri* coinfections with other haemopathogens in the slaughterhouses of Quito and Santo Domingo.

Slaughterhouse	<i>T. theileri</i> (PCR CATL Like)	<i>T. vivax</i> (PCR CATL Like)	<i>A. marginale</i> PCR <i>msp5</i>	<i>B. bovis</i> PCR <i>RAP-1</i>	<i>B. bigemina</i> PCR <i>HYP</i>	Total <i>N</i> <sup>o</sup> (%)
<b>Quito</b>						
	-	-	-	-	-	21 (25.3)
	-	-	+	-	-	32 (38.6)
	-	-	+	-	+	1 (1.2)
	-	-	+	+	-	1 (1.2)
	-	-	+	+	+	2 (2.4)
	-	+	-	-	+	1 (1.2)
	-	+	+	-	-	5 (6.0)
	+	-	+	-	-	15 (18.1)
	+	+	+	-	-	5 (6.0)
<b>Santo Domingo</b>						
	-	-	-	-	-	59 (43.7)
	-	-	-	+	+	1 (0.7)
	-	-	+	-	-	59 (43.7)
	-	-	+	-	+	1 (0.7)
	-	-	+	+	+	1 (0.7)
	+	-	-	-	-	3 (2.2)
	+	-	+	-	-	6 (4.4)
	+	+	-	-	-	2 (1.5)
	+	+	+	-	-	3 (2.2)

+ Positive and – Negative.

resources on haemopathogen agents that affect the cattle industry in this country and region.

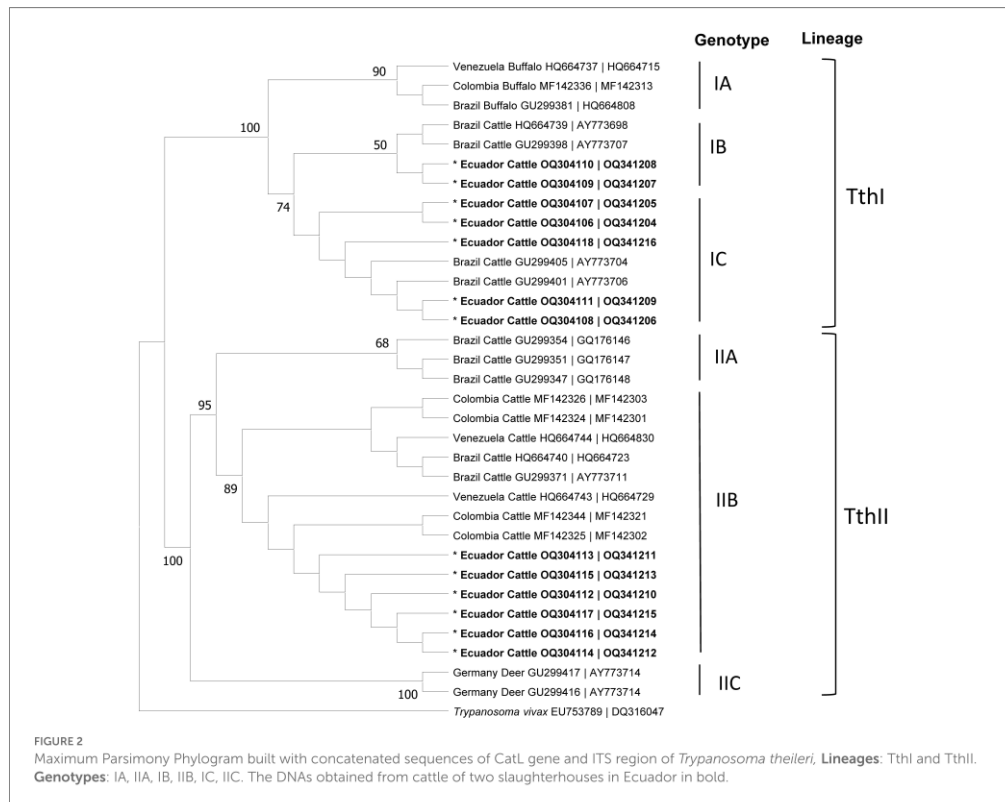
Prevalence values obtained from the two slaughterhouses, in Quito and Santo Domingo, evidenced the presence of several haemopathogens, including in decreasing order: *A. marginale* (60.1%, the most predominant), *T. theileri* (15.6%), *T. vivax* (7.3%), *Babesia bovis* (3.2%), *B. bigemina* (2.3%) and *T. evansi* (0 %). Our study did not evidence *T. evansi* in any of the bovine samples from the two slaughterhouses. These values are compatible with previous studies in Ecuador, 31.0% for *Trypanosoma spp* and 65.5% for *A. marginale* in the Pastaza province (19) and 86.1% in the Santo Domingo de los Tsachilas province (22), 18.94 and 20.28% for *Babesia spp* in the Pichincha and Manabí provinces, respectively (25).

The implementation of molecular diagnostic tests such as the CATL-like PCR for *T. theileri* and *T. vivax* and *msp5* PCR for *A. marginale* showed mixed infections of *T. theileri* with *A. marginale*, as well as *T. theileri*, *T. vivax* and *A. marginale* in the Quito (*n* = 20) and Santo Domingo (*n* = 14) abattoirs. Coinfections with other haemotrops have been reported in Colombia, where 53.9% of the bovines present mixed infections and 26.7% presented coinfections of *T. theileri* with *A. marginale* (6). In another study, 83.3% of the bovines positive to *T. theileri* showed coinfection with other haemopathogens (36). All the animals infected with the genotyped *T. theileri* carried mixed infections, which reinforces

the hypothesis that we are in the presence of an opportunistic parasite (9).

Although this study did not present a clinical assessment of the animals in the abattoirs, PCV analysis showed normal levels, above 24%, in all the bovine specimens, including those in the animals positive to *T. theileri*. This is in agreement with previous reports that show that bovines infected with *T. theileri* do not suffer from anemia and have normal levels of erythrocytes (40, 41). However, in spite of this, *T. theileri* can be considered a potentially pathogenic parasite, in association with other haemopathogens, as evidenced in a livestock area in Colombia, where *T. theileri* infection was higher in bovines with signs of anemia (9). Furthermore, *T. theileri* infections may result in chronic and mild clinical signs, with low and persistent parasitemias (8), as could be the case for the bovines that were included in this study, whose hematocrit levels were above 24%. These different pieces of evidence highlight the need to further investigate the possible link between coinfection with *T. theileri* and other haemopathogens and clinical disease.

The prevalence of *T. theileri* based on the HCT (14.5 %) and PCR CATL-like (24.1%) tests was higher in the Quito abattoir as compared to the Santo Domingo slaughterhouse, with 0.7 and 10.4% prevalence values, respectively. The bovines positive to *T. theileri* (20/83), in the Quito abattoir originated in the Santo Domingo province in the Coastal region and in the Orellana province in the Amazon region. The difference in the distribution of the positive results of HCT suggests that bovine trypanosomosis



in the Coastal region is endemic, unlike the Amazon region where disease outbreaks can occur. This proposal is reinforced by the recent finding of a large percentage of *Trypanosoma* spp. positive farms (8/32) in the Amazon region, using the HCT (Chávez-Larrea et al. data not published). This could be related with the great diversity of animal reservoirs, both livestock and/or wildlife in the Amazon region.

Statistical analysis of the *T. theileri* positive animals from the Quito slaughterhouse showed no significant differences concerning bovine species, nonetheless significant differences were observed in relationship to sex, with a higher prevalence in males. Even though creole cattle breeds could be a risk factor associated with the presence of *Trypanosoma* spp., as suggested by Jaimes-Dueñez et al. (42) in Colombia studying creole races, additional research is needed to clarify the role of other risk factors, including sex and host species.

*T. theileri* has been reported in various animal species including bovines, buffaloes (Asia, South America), antelopes (Africa) (4), horse in Malaysia (43) and bats (44), with several lineages and genotypes. The implementation of molecular diagnostic techniques using CatL and ITS fragments, followed by DNA sequencing and analysis have been previously used to analyze *T. theileri* genotypes (39, 40, 45). The two *T. theileri* lineages, Tth I and TthII identified in this study have been reported in other South American countries,

including Colombia (9), Brazil and Venezuela (29, 39, 46). Several genotypes have been identified within these lineages as specific for each host species, such is the case for bovines (IIA, IB, IIB, IC), buffaloes (IA) and deers (IIC) (9, 29, 46). Genotypes IB, IIB and IC, which have been previously described in Brazil, Venezuela and Colombia (9, 11, 39) were identified in this study. Genotype IIB was the most prevalent in the samples that were analyzed in this study (6/13), which is also consistent with the most prevalent genotype in South America (9, 39). Likewise, in the study carried out by De la Cadena et al. (21), in the Ecuadorian Amazon, they point out the presence of the TthI and TthII genotypes using the cathepsin L-like and 18S ribosomal DNA for the phylogenetic tree.

The *T. theileri* sequences from the Quito and Santo Domingo slaughterhouses were placed within the clade of the Colombian isolates. It is possible that cattle displacement between the two countries might be responsible for the introduction of *T. theileri* to Ecuador. Very little is known about the origin of the first bovines that arrived in Ecuador. According to a study on the indigenous breeds, the first bovines being introduced in the XV century during the Spanish colonization, with some were introduced from the Pacific coast of Colombia and Panama and some from Rio de la Plata (47). This mobilization of cattle appears to have influenced the distribution of genotype IIB, which is the most disseminated in South America from cattle of Iberian origin (9). The other

genotypes found in our study, IB and IC, like those found in Brazil, maybe were introduced more recently (9).

In Ecuador, the regions below 1,000 masl are found both in the coastal and Amazon regions. These two zones are separated by the Sierra region (Los Andes), where the heights range from 2,000 to 4,000 meters above sea level. For this reason, in this work, only animals positive for *T. theileri* were found in the coastal region (Province Santo Domingo de los Tsachilas) and the Amazon region (Province Orellana) (Figure 1).

In America, the transmission of *Trypanosoma* spp in bovine cattle is mainly mechanical, through Tabanids and other blood-sucking flies (4). Tabanids also appear to play an essential role in the transmission of *A. marginale* too (48). In the present study, the estimated prevalence for *A. marginale* was 38.6% in the Quito slaughterhouse and 43.70% in the Santo Domingo slaughterhouse. Most of the animals were coinfecting with this bacteria, possibly due to high prevalence of *A. marginale* all over the country. There have not been any studies in Ecuador on the importance of Tabanids and other blood-sucking flies as vectors for these diseases in livestock. The presence of the *T. theileri* genotypes has also been shown in Tabanids, which reinforces their role in the dissemination of *Trypanosoma* spp in America (46).

## 5. Conclusions

This study constitutes the first report of lineages TthI and TthII and genotypes IB, IC and IIB of *T. theileri* in bovine cattle in Ecuador (Figure 2), a finding that could be important to establish the genetic relationship between the variants present in this country and others in the region. On the other hand, existing coinfections between *T. theileri*, *T. vivax*, *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* were also evaluated at the slaughterhouse level.

This study underscores the presence of *T. theileri* in livestock in Ecuador, with a prevalence of 15.6% (34/218). Even though, *T. theileri* can be considered non-pathogenic or mildly pathogenic, further studies are needed to evaluate the epidemiological situation in the region and its true impact on the health of bovines and other susceptible species, especially in case of coinfection with other haemopathogens.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

Ethical review and approval was not required for the animal study because the work was carried out with animals from

slaughterhouses, after their sacrifice. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

## Author contributions

Conceptualization: MC-L, CS, and AR-B. Methodology, data curation, and writing—original draft preparation: MC-L. Validation: MC-L, JC-V, AR-C, and CC-I. Formal analysis: MC-L, CC-I, and JR-R. Investigation: MC-L and AR-B. Writing—review and editing: AR-B, JR-R, and CS. Supervision: AR-C and CS. Project administration: JR-R and AR-B. Funding acquisition: CS, JR-R, and AR-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

This work was funded by the Academy of Research and Higher Education (ARES) Belgica and Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE-Ecuador through the project entitled Establishment of a platform to support training and awareness, diagnosis and development of a control strategy for brucellosis and trypanosomosis in Ecuador (acronym: BruTryp), Registered in the ESPE under the number CV-GNP-0056-2020.

## Acknowledgments

We thank the managers of the Quito and Santo Domingo slaughterhouse, who allowed the collection of bovine blood. We are also thankful to the undergraduate students of Biotechnology of the ESPE University, in Quito and Santo Domingo, for their work collecting data in the slaughterhouses. Finally, we thank the Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, for supporting and stimulating us in this work.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos Ecuador INEC. *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. Quito-Ecuador: INEC (2019). p. 33.
- Galeas R, Guevara J, Medina Torres B, Chinchero MA, Herrera X. *Sistema de Clasificación de Ecosistemas del Ecuador Continental*. 1<sup>ra</sup> ed. Quito-Ecuador: Sistema Nacional de Información (2013). p. 239 (Ministerio del Ambiente del Ecuador. Subsecretaría de Patrimonio Natural, Quito; vol. 1).
- Ron-Román J, Ron-Garrido L, Abatih E, Celi-Erazo M, Vizcaino-Ordóñez L, Calva-Pacheco J, et al. Bayesian evaluation of three serological tests for detecting antibodies against *Brucella* spp. among humans in the northwestern part of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg.* (2019) 100:1312–20. doi: 10.4269/ajtmh.18-0622
- Desquesnes M. *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. Paris: OIE (2004). p. 174.
- Hoare CA. *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.* (1972). Available online at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19722902365> (accessed September 2, 2022).
- Jaimes-Duñez J, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Tick Tick Borne Dis.* (2017) 8:290–9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.12.002
- Hajihassani A, Maroufi S, Esmatnejad B, Khorram H, Tavassoli M, Dalir-Naghadeh B, et al. Hemolytic anemia associated with *Trypanosoma theileri* in a cow from Kurdistan province, West of Iran. *Vet Res Forum.* (2020) 11:191–3. doi: 10.30466/vrf.2019.103834.2465
- Kelly S, Ivens A, Mott GA, O'Neill E, Emms D, Madedo O, et al. An alternative strategy for trypanosome survival in the mammalian bloodstream revealed through genome and transcriptome analysis of the ubiquitous bovine parasite *Trypanosoma (megatrypanum) theileri*. *Genome Biol Evol.* (2017) 9:2093–109. doi: 10.1093/gbe/evx152
- Jaimes-Duñez J, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM. Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Vet Parasitol.* (2018) 249:30–42. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.11.004
- Calzolari M, Rugna G, Clementi E, Carra E, Pinna M, Bergamini F, et al. Isolation of a trypanosome related to *Trypanosoma theileri* (kinetoplastea: Trypanosomatidae) from *Phlebotomus perfiliewi* (diptera: Psychodidae). *Biomed Res Int.* (2018) 2018:2597074. doi: 10.1155/2018/2597074
- Pacheco TDA, Marcili A, Costa AP da, Witter R, Melo ALT, Boas RV, et al. Genetic diversity and molecular survey of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* in cattle in Brazil's western Amazon region. *Rev Bras Parasitol Vet.* (2018) 27:579–83. doi: 10.1590/s1984-296120180049
- Böse R, Heister NC. Development of *Trypanosoma (M.) theileri* in Tabanids. *J Eukaryot Microbiol.* (1993) 40:788–92. doi: 10.1111/j.1550-7408.1993.tb04475.x
- Werszko J, Szewczyk T, Steiner-Bogdaszewska Z, Wróblewski P, Karbowski G, Laskowski Z. Molecular detection of *Megatrypanum* trypanosomes in tabanid flies. *Med Vet Entomol.* (2020) 34:69–73. doi: 10.1111/mve.12409
- Cárdenas RE, Buestand J, Dangles O. Diversity and distribution models of horse flies (diptera: Tabanidae) from Ecuador. *Int J Entomol.* (2009) 45:511–28. doi: 10.1080/00379271.2009.10697633
- Desquesnes M, Gonzatti M, Szamand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, et al. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites Vectors*. (2022) 15:64. doi: 10.1186/s13071-022-05190-1
- Brotánková A, Fialová M, Cepička I, Brzonová J, Svobodová M. Trypanosomes of the *Trypanosoma theileri* group: phylogeny and new potential vectors. *Microorganisms.* (2022) 10:294. doi: 10.3390/microorganisms10020294
- Rashid M, Rashid MI, Akbar H, Ahmad I, Hassan MA, Ashraf K, et al. A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology.* (2019) 146:129–41. doi: 10.1017/S0031182018001282
- Coello-Peralta RD, Cabrera Solórzano NC, Salazar Mazamba MdL, Reyes Echeverría EO, Andrade Velásquez LL, Pazmiño Gómez BJ. Natural infection of *Trypanosoma* sp. in domestic sheep from Ecuador. *Ciencia Rural.* (2022) 9. doi: 10.1590/0103-8478cr20210141
- Medina-Naranjo VL, Reyna-Bello A, Tavares-Marques LM, Campos AM. Diagnóstico de Los Hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* Spp. y *Babesia* Spp. mediante Las Técnicas de ELISA y PCR En Tres Fincas Ganaderas de La Provincia de Pastaza, Ecuador. *Revista Científica.* (2017) 27:162–71.
- Chávez-Larrea MA, Medina-Pozo ML, Cholota-Iza CE, Jumbo-Moreira JR, Saegerman C, Proaño-Pérez F, et al. First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transbound Emerg Dis.* (2021) 68:2422–8. doi: 10.1111/tbed.13906
- De la Cadena E, Camacho M, Vaca F, Enríquez S, Elezalde MC, Arrivillaga-Henríquez J, et al. Molecular identification of *Trypanosoma theileri* in cattle from the Ecuadorian Amazon. *Vet Parasitol Reg Stud Rep.* (2023) 37:100824. doi: 10.1016/j.vprsr.2022.100824
- Tana-Hernández L, Navarrete-Arroyo K, Ron-Román J, Reyna-Bello A, Chávez-Larrea MA. PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Vet Res.* (2017) 13:392. doi: 10.1186/s12917-017-1311-1
- Guarnizo TRM, Alvarez DO, Díaz-Sánchez AA, Cabezas-Cruz A, Gutiérrez LZ, Marrero SM, et al. Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Ticks Tick Borne Dis.* (2020) 11:101380. doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101380
- Gioia GV, Vinuela RL, Marsot M, Devillers E, Cruz M, Petit E, et al. Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transbound Emerg Dis.* (2018) 65:1262–71
- Chávez-Larrea MA, Cholota-Iza C, Medina-Naranjo V, Yugcha-Díaz M, Ron-Román J, Martín-Solano S, et al. Detection of *Babesia* spp. in high altitude cattle in Ecuador, possible evidence of the adaptation of vectors and diseases to new climatic conditions. *Pathogens.* (2021) 10:1593. doi: 10.3390/pathogens10121593
- García HA, Blanco PA, Rodrigues AC, Rodrigues CMF, Takata CSA, Campaner M, et al. Pan-American *Trypanosoma (Megatrypanum) trinaperronei* n. sp. in the white-tailed deer *Odocoileus virginianus zimmermanni* and its deer ked *Lipoptena mazamae rondani*, 1878: morphological, developmental and phylogeographical characterisation. *Parasit Vectors.* (2020) 13:308. doi: 10.1186/s13071-020-04169-0
- Guillen MF. *Informe de Rendición de cuentas*. Quito-Ecuador: Empresa Pública Metropolitana de Rastro Quito (2020). p. 39. Report No.: 1.
- OIE. *Trypanosomosis Animales (transmitidas por la mosca tse-tse, excepto la surra y la durina)*. In: *Manual Terrestres de la OIE*. OIE (2018). p. 15.
- Rodrigues AC, Garcia HA, Ortiz PA, Cortez AP, Martinkovic F, Paiva F, et al. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitol Int.* (2010) 59:318–25. doi: 10.1016/j.parint.2010.03.002
- Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America: characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes.* (2009) 23:44–51. doi: 10.1016/j.mcp.2008.11.003
- Cox A, Tilley A, McOdimba F, Fyfe J, Eisler M, Hide G, et al. A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Exp Parasitol.* (2005) 111:24–9. doi: 10.1016/j.exppara.2005.03.014
- Holland WG, Claes F, My LN, Thanh NG, Tam PT, Verloot D, et al. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet Parasitol.* (2001) 97:23–33. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00381-8
- Reyna-Bello A, Cloeckaert A, Vizcaino N, Gonzatti MI, Aso PM, Dubray G, et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin Diagn Lab Immunol.* (1998) 5:259–62. doi: 10.1128/CDLI.5.2.259-262.1998
- Figuerola JV, Chievas LP, Johnson GS, Bueening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Vet Parasitol.* (1993) 50:69–81. doi: 10.1016/0304-4017(93)90008-B
- Figuerola JV, Chievas LP, Johnson GS, Bueening GM. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol.* (1992) 30:2576–82. doi: 10.1128/jcm.30.10.2576-2582.1992
- Yokoyama N, Sivakumar T, Fukushima S, Tattiyapong M, Tvshintulga B, Kothalawala H, et al. Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. *Vet Parasitol.* (2015) 207:335–41. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.12.006
- Jackson AP, Berry A, Aslett M, Allison HC, Burton P, Vavrova-Anderson J, et al. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2012) 109:3416–21. doi: 10.1073/pnas.1117313109
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* (2018) 35:1547–9. doi: 10.1093/molbev/msy096
- García HA, Kamyngkird K, Rodrigues AC, Jittapalpong S, Teixeira MMG, Desquesnes M. High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. *Vet Parasitol.* (2011) 180:363–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.017
- Amato B, Mira F, Di Marco Lo Presti V, Guercio A, Russotto L, Gucciarci F, et al. A case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma theileri* in Sicily, Italy. *Parasitol Res.* (2019) 118:2723–7. doi: 10.1007/s00436-019-06390-y

41. Bittner L, Krämer K, Wöckel A, Snedec T, Delling C, Böttcher D, et al. Malnutrition as the cause of recumbency in suckler cows associated with *Trypanosoma theileri* infection. *Acta Vet Scand.* (2021) 63:2. doi: 10.1186/s13028-020-00567-7
42. Jaimes-Duñez J, Mogollón-Waltero E, Arias-Landazabal N, Rangel-Pachon D, Jimenez-Leaño A, Mejía-Jaramillo A, et al. Molecular surveillance of *Trypanosoma* spp. reveals different clinical and epidemiological characteristics associated with the infection in three creole cattle breeds from Colombia. *Prev Vet Med.* (2021) 193:105414. doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105414
43. Tan LP, Mohd Rajdi NZI, Mohamad MA, Mohamed M, Hamdan RH, Goriman Khan MAK, et al. First report of *Trypanosoma theileri* in equine host and tabanus sp. in Malaysia. *J Equine Vet Sci.* (2021) 108:103807. doi: 10.1016/j.jevs.2021.103807
44. Jaimes-Duñez J, Cantillo-Barraza O, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM. Molecular surveillance reveals bats from eastern Colombia infected with *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma wauwau*-like parasites. *Prev Vet Med.* (2020) 184:105159. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105159
45. Suganuma K, Kondoh D, Sivakumar T, Mizushima D, Elata ATM, Thekiso OMM, et al. Molecular characterization of a new *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle. *Parasitol Res.* (2019) 118:1927–35. doi: 10.1007/s00436-019-06313-x
46. Rodrigues AC, Paiva F, Campaner M, Stevens JR, Noyes HA, Teixeira MMG. Phylogeny of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* and related trypanosomes reveals lineages of isolates associated with artiodactyl hosts diverging on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology.* (2005) 132:215. doi: 10.1017/S0031182005008929
47. Delgado Bermejo JV, Barba Capote CJ, Aguirre Riofrío EL, Cabezas Congo R, Cevallos Falquez OF, Rizzo Zamora LG, et al. Molecular inference in the colonization of cattle in Ecuador. *Res Vet Sci.* (2020) 132:357–68. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.011
48. Hornok S, Földvári G, Elek V, Naranjo V, Farkas R, de la Fuente J. Molecular identification of *Anaplasma marginale* and rickettsial endosymbionts in blood-sucking flies (Diptera: Tabanidae, Muscidae) and hard ticks (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol.* (2008) 154:354–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.03.019

---

## Section expérimentale

### **Etude 5 :**

**First report of *Trypanosoma vivax* (*Duttonella*), *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in cattle from the Galapagos Islands, Ecuador, and its relationship with *Anaplasma marginale***

---

<i>Accepté dans Pathogens</i>
-------------------------------

María Augusta Chávez-Larrea, Cristina Cholota-Iza, Michelle Yugcha-Diaz, Jorge Ron-Román, Freddy Proaño-Pérez, Alicia Maya-Delgado, Jimmy Jumbo-Moreira, Armando Reyna-Bello and Claude Saegerman

## *Préambule*

L'une des régions envisagées pour l'étude des agents hémotropes était les îles Galápagos (Région Insulaire), parce qu'on y trouve des élevages de bovins et aussi en raison de la présence de taons autour du bétail. Entre février et juin 2017, un total de 170 échantillons de bétail a été collecté à Puerto Ayora, Bella Vista et Santa Rosa sur l'île de Santa Cruz. Bien que cet échantillonnage ait été réalisé en 2017 dans le cadre des activités d'un projet communautaire financé par l'Université des Forces Armées, ESPE, les échantillons ont été conservés à -80°C. Plus tard en 2023 et grâce au financement du projet BruTryp de l'ARES, une analyse moléculaire des échantillons a été réalisée.

Les échantillons ont été analysés par une technique PCR uniplex visant à identifier les gènes de *T. vivax* et *T. theileri* (*CatL*), *T. evansi* (*ESAG*), *Babesia* spp, (*ARNr 18S*), *B. bovis* (*rap-1a*), *B. bigemina* (*hyp*) et *A. marginale* (*msp5*). Les résultats ont démontré pour la première fois la présence de *T. vivax* et de *B. bovis* chez les bovins de l'île de Santa Cruz aux Galápagos.

Comme cela a déjà été mis en évidence dans nos études dans d'autres régions du continent équatorien, des co-infections ont été trouvées parmi ces agents hémotropes. Ainsi une triple co-infection à *A. marginale*, *Babesia* spp et *T. vivax* a été observée chez 36,8% (7/19) des élevages et chez 3,5% (6/170) des bovins. Ces bovins infectés avaient une température corporelle significativement plus élevée que les autres. La prévalence chez les bovins de *T. vivax*, *Babesia* spp., *B. bovis*, *B. bigemina* et *A. marginale* était respectivement de 14,7 %, 20 %, 11,2 %, 14,7 % et 67,1 %.

**First Report of *Trypanosoma vivax* (Duttonella), *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* DNA in Cattle from the Galapagos Islands, Ecuador, and Its Relationship with *Anaplasma marginale***

María Augusta Chávez-Larrea<sup>1,2</sup>, Cristina Cholota-Iza<sup>2</sup>, Michelle Yugcha-Díaz<sup>2</sup>, Jorge Ron-Román<sup>2</sup>, Freddy Proaño-Pérez<sup>2,3</sup>, Alicia Maya-Delgado<sup>1,2</sup>, Jimmy Jumbo-Moreira<sup>4</sup>, Armando Reyna-Bello<sup>2,\*§</sup>, Claude Saegerman<sup>1,\*§</sup>.

<sup>1</sup> Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULiège), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; machavezlarrea@student.uliege.be (M.A.CH.-L.), C.S.), afmaya@doct.uliege.be (A.F.M).

<sup>2</sup> Animal and Human Health Research Group (GISAH), Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE, Sangolquí, Ecuador, (M.A.CH.L), (C.CH.I), emyugcha@espe.edu.ec (M.Y.D), fwproano@espe.edu.ec (F.P.P), jwron@espe.edu.ec (J.R.R), aareyna@espe.edu.ec (A.R.B), aliciafermaya@gmail.com (A.F.M).

<sup>3</sup> Instituto de Investigación en Zoonosis – CIZ, Universidad Central de Ecuador, Quito, Ecuador, fwproano@uce.edu.ec (F.P.P).

<sup>4</sup> Carrera de Ingeniería en Biotecnología, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Ecuador, jimmyjumbo93@gmail.com (J.J.M).

**\* Correspondence:**

claude.saegerman@uliege.be and aareyna@espe.edu.ec

<sup>§</sup> Both authors contributed equally to the work.

## Abstract

Bovine trypanosomoses, caused by *Trypanosoma vivax*, is a disease present in African and South American countries. This haemoflagellate protozoan parasite, as well as *Anaplasma marginale* and *Babesia* spp., are microorganisms that have a blood tropism, mainly causing fever and anemia, which reduces the productive capacity of dairy or meat farms. This study aimed to detect *T. vivax* and other blood parasites in bovine herds in the Galapagos Islands. A total of 170 blood samples from bovines in 19 farms on Santa Cruz Island (the most populated) were collected and analyzed using different PCR techniques: *Da*-PCR and *CatL*-PCR to detect *Trypanosoma vivax*, *CatL*-PCR to detect *Trypanosoma theileri*, *ESAG*-PCR to detect *Trypanosoma evansi*, *18S rRNA*-PCR to detect *Babesia* spp., *rap-1*-PCR to detect *Babesia bovis*, *hyp*-PCR to detect *Babesia bigemina*, and *msp5*-PCR to detect *A. marginale*. The prevalence of *T. vivax*, *B. bovis*, *B. bigemina*, and *A. marginale* was estimated as 14.7%, 11.2%, 14.7%, and 67.1%, respectively. In this study, the presence of four haemotropic agents was evidenced in 26.3% (5/19) of the farms. Coinfected cattle (*A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina*) had significantly higher body temperatures compared to others (two-sample Wilcoxon rank-sum test;  $p$ -value = 0.047). The molecular techniques used in this study demonstrated the presence of *T. vivax* and *B. bovis* in cattle from Santa Cruz Island in the Galapagos for the first time. The study also investigates the relationship between *T. vivax*, *A. marginale* and *Babesia* spp., making a significant contribution to the field of veterinary medicine.

**Keywords:** Trypanosomoses, *Trypanosoma vivax*, cattle, Galápagos, *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, Ecuador.

## 1. Introduction

Trypanosomoses caused by *Trypanosoma vivax* in cattle is a disease reported in all South American countries except Suriname, Chile, and Uruguay [1]. In South America, *T. vivax* can present as epizootic outbreaks with clinical signs such as anemia, fever, anorexia, weight loss, drop in milk production, neurological disorders, loss of reproductive capacity, and abortions [2–4]. It is expected to find subclinical carriers in chronic stages of the disease [5].

Other species, such as *T. evansi* and *T. theileri*, that affect cattle have been reported in South America. In the case of *T. theileri*, it is a cosmopolitan protozoan considered non-pathogenic for cattle. However, it can be an opportunistic parasite during coinfections with other haemotropic agents such as *T. vivax*, *T. evansi*, *A. marginale* and *Babesia* spp. [6]. *Trypanosoma evansi* can naturally parasitize several domestic and wild mammals, where its pathogenicity is varied [7]. In South America, the disease in cattle can present asymptotically, although a decrease in hematocrit has been evidenced without other apparent clinical signs associated with the disease [8].

Coinfections of *T. vivax* with other pathogens, such as *A. marginale* and *Babesia* spp., have been reported in bovine production systems in Continental Ecuador [9]. This coinfection, accompanied by high parasitemia, destroys erythrocytes by different mechanisms and produces clinical signs such as anemia, pale mucous membranes, weakness, anorexia, and lethargy, which makes diagnosis difficult [10,11]

Ticks are involved in transmitting the aforementioned haemotropic agent of *Babesia* spp., and *Rhipicephalus microplus* is the main vector in South America [7]. *A. marginale* transmission is also mechanical, through blood-sucking flies such as horseflies and contaminated fomites, as well as ticks [10,12]. However, *T. vivax* is exclusively transmitted by blood-sucking flies, such as tabanids and *Stomoxys calcitrans* [5].

In American tropical and subtropical areas, *A. marginale*, *Babesia* spp. and *Trypanosoma* spp. cause economic losses that are difficult to estimate. These losses can be related to a drop in milk production, weight loss, mortality, treatment and control [10], and animal marketing [11]. In Argentina, after an outbreak of *T. vivax* in a farm with 220 dairy cows, losses were estimated at 58.802 USD due to animal deaths, abortions, and low or absence of milk production [13]. In the Pantanal area of Brazil, with a population of about 11 million cattle, an outbreak of *T. vivax* was reported in 1995; losses were estimated at 4% of the value of the herd due to treatment, deaths of cattle, abortions, and loss of production [14]. On the African continent, losses were estimated at 5 million dollars per year, mainly due to low milk and meat production [15].

Species within the genus of *Trypanosoma* do affect a wide animal variety including insects, birds, fish, amphibians, reptiles and mammals [16]. In South America, *T. vivax* has been detected in cattle, goats, sheep, horses, buffaloes, and deer; however, in Africa, approximately 40 wild mammal species can carry out the parasite [1]. Recent studies in continental Ecuador, using molecular techniques, demonstrated the presence of *T. theileri* in cattle from slaughterhouses and the Amazon region [9,17]. Medina et al. (2017), in a study in the Pastaza province of the Amazon region, found a seroprevalence of 31.03% for *Trypanosoma* spp. and 65.5% for *A. marginale* [18]. Until now, the distribution and epidemiological aspects of *T. vivax* are unknown, although the first evidence of this protozoan was reported by Wells et al. (1977) through the indirect immunofluorescence technique, with a seroprevalence of 22.3% [19]. Later, their presence was confirmed using molecular techniques in an outbreak in the province of Manabí [20].

In the Galapagos Islands, an insular region of Ecuador with 19 islands and 200 islets and rocks, only four islands are populated (Isabela, Santa Cruz, San Cristóbal, and Floreana) in which agricultural activities are carried out [21]. The 2014 Agricultural Census shows Galapagos Islands have 10,100 cattle [22]. A study carried out by Rhea et al. (2023) in Floreana Island showed the highest production is

poultry (90 birds in eight farms), pigs (26 pigs in six farms) and cattle (28 cattle in five farms) [23]. In the Galapagos Islands, approximately 37.5% of producers have cattle, the species of most significant economic importance [24].

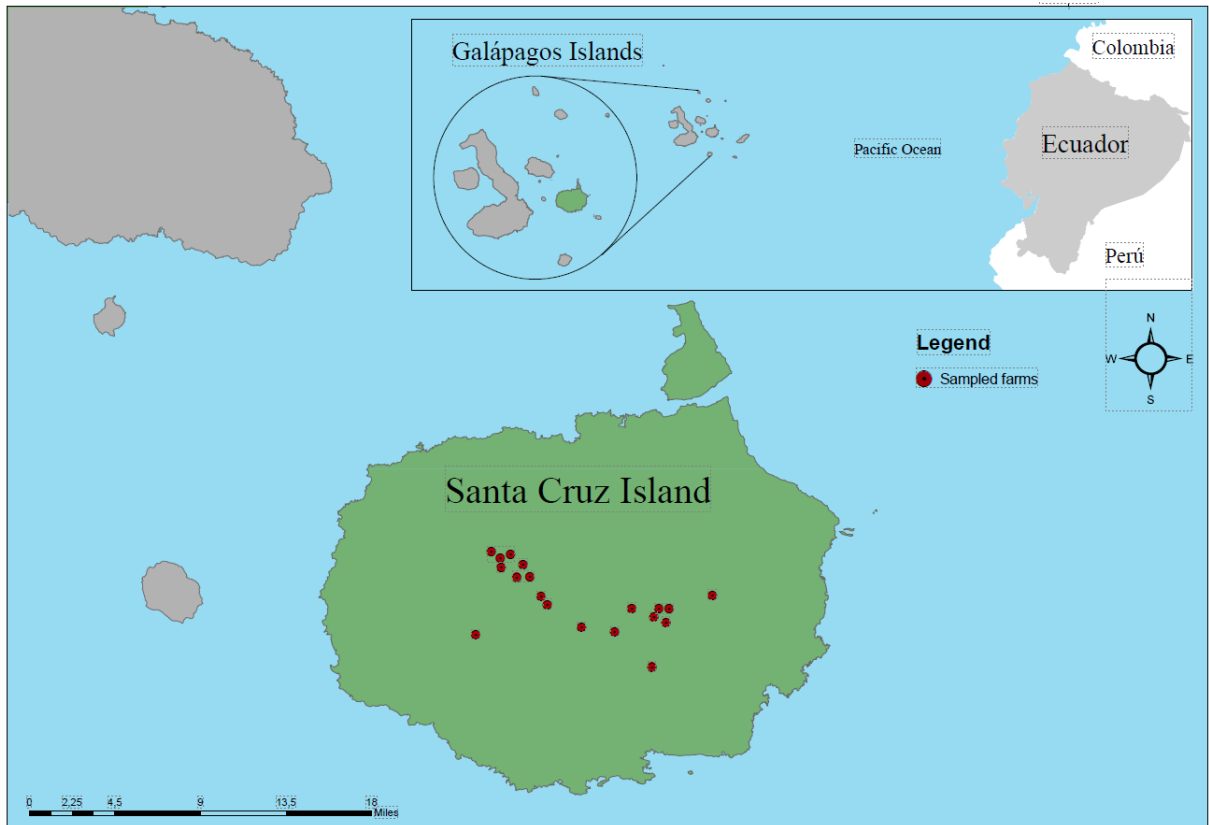
In the Galapagos Islands, the presence of *T. vivax* in cattle has yet to be demonstrated. However, in this province, agents transmitted by vectors have already been reported in cattle and other animal species. Gioia et al. (2017) found *A. marginale* on the islands of Santa Cruz, San Cristóbal, and Isabela, also demonstrating a prevalence of 93.2% in cattle; the same study identified the presence of *A. marginale*, *B. bigemina*, and *Borrelia theileri* in ticks [25]. In other species, such as dogs, antibodies against *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. were found on Santa Cruz Island [26]. Another study on 390 marine iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*) carried out on eleven islands showed that 25% of the iguanas were infected by haemotropic agents of the genus *Hepatozoon* and/or *Hemolivia* (Apicomplexa: Eucoccidiorida) [27].

The evidence of *T. vivax* and *Babesia* spp. in cattle of the Galapagos Islands will allow the establishment of control plans on livestock farms monitoring the probability of threat to endemic and introduced animal species on the island. Therefore, this study aimed to detect *T. vivax*, *Babesia* spp. and other blood pathogens, as well as the risks of mixed infections, in the cattle production systems of Santa Cruz Island.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area and collection of blood samples.

The insular province of Galapagos is located 972 km away from continental Ecuador and includes 761.844 hectares corresponding to the National Park (96.7%) and 26.356 hectares of populated area (3.3%) (Figure 1). Administratively, the territory is divided into three cantons: (1) Santa Cruz Island, made up of the Puerto Ayora, Bellavista, and Santa Rosa parishes; (2) San Cristóbal Island, with the parishes Puerto Baquerizo, Progreso and Santa María (Floreana Island), and (3) Isabela Island, with the parishes Puerto Villamil and Tomás de Berlanga. The temperature varies from 26 °C to 28 °C from January to April to less than 24 °C in the rest of the year [21].



**Figure 1.** Location of the farms sampled on Santa Cruz Island, Galapagos Archipelago, Ecuador

This study was carried out on Santa Cruz Island in 2017 (Figure 1), located in the centre of the archipelago, which has an area of 986 km<sup>2</sup> and a maximum altitude of 864 m above sea level [21].

The accuracy and precision of this study were ensured through the representativeness and size of the sample used. Sampling was carried out in two stages: (1) at the farm level and (2) at the animal level. For this purpose, the farms were categorized into small (less than 28 cattle), medium (between 29 and 60 cattle), and large (more than 61). There are approximately 755 UPAs in the Galapagos, 47% (355) of which are located in Santa Cruz [24], using a database facilitated by the ABG (Agency for Regulation and Control of Biosafety and Quarantine for Galapagos), 5.4% (19/355) were sampled on Santa Cruz Island. At the farm level, at least 10% of the animals were randomly sampled. In total, 170 cattle samples from Puerto Ayora, Bella Vista, and Santa Rosa in Santa Cruz Island were collected between February and June 2017. Blood samples were collected in tubes with EDTA by puncture of the coccygeal vein. Respecting the cold chain, the samples were first processed in the Fabricio Valverde laboratory of the Galapagos National Park and subsequently transported to Laboratorio de Biotecnología Animal at the Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (headquarters—Quito) for molecular tests

analysis.

The zootechnical and sanitary-epidemiological information of the sampled cattle was collected through sampling and survey records. The age of the sampled animals was divided into four categories: 0 to 9 months, 10 to 18 months, 19 to 36 months, and older than 36 months.

## 2.2. DNA extraction

DNA extraction from cattle blood samples was performed using the Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, USA), following the manufacturer's instructions. The purity of the DNA was verified on 0.8% agarose gel electrophoresis and quantified by UV spectrophotometry using the Multiskan Sky High equipment (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA).

## 2.3. Diagnostic of haemotropic agents by PCR

We performed a PCR end point to each primer pair (Table 1) to specifically detect the *T. vivax*, *T. evansi*, *T. theileri*, *B. bovis*, *B. bigemina*, and *A. marginale*. The diagnosis of *T. vivax* was made using ILO 1264 and ILO 1265 primers. In the case of *Babesia*, first, a PCR was run with PIRO A and PIRO B primers, which detected the presence of *Babesia* sp.; afterwards, the positive samples were run with *B. bovis* (BoF and BoR), and *B. bigemina* (BilA and BilB) specific primers.

GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix 1X (Promega, Madison WI, USA), between 100–150 µg of DNA from each sample, and primer concentration specific for each primer were employed in the reaction mix. Primers concentration were 0.2 µM of ILO 1264 and ILO 1265, 0.25 µM of PIRO A and PIRO B, 0.3 µM of TthCatL and DTO155, 0.5 µM of TviCatL and DTO155, ESAG 6/7F and ESAG 6/7R, BoF and BoR, BilA and BilA, and 19A and 19B. Thermal cycler conditions were those established by the authors of the primers or modified in subsequent studies. These conditions are shown in Table 1; in some of the PCR, the hybridization temperatures were modified to improve results, mainly to eliminate nonspecific bands or increase the band intensity.

Table 1. Primer information used in this study.

Organism	Target Gen	Primers (Sequence 5'-3')	Size (bp)	Thermocycler Conditions					References
				1 Cycle ID	D	35 Cycles H	E	1 Cycle FE	
<i>T. vivax</i>	<i>Diagnostic antigen (Da)</i>	ILO 1264 (CAGCTCGGCGAAGGCCACTTGCTGGG)	~400	5' to 95 °C	30" to 95 °C	30" to 60 °C	1' to 72 °C	10' to 72 °C	[28,29]
		ILO 1265 (TCGCTACCACAGTCGCAATCGTCTCAAGG)							
<i>T. vivax</i>	<i>CatL</i>	TviCatL1 (CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC)	~177	5' to 94 °C	30" to 94 °C *	30" to 65 °C	30" to 72 °C	10' to 72 °C	[20,30]
		DT0155 (TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA)							
<i>T. evansi</i>	<i>ESAG</i>	ESAG 6/7F (ACATTCCAGCAGGAGTTGGAG)	~237	4' to 94 °C	1' to 94 °C	1' to 65 °C	30" to 72 °C	5' to 72 °C	[31,32]
		ESAG 6/7R (CACGTGAATCCTCAATTTTGT)							
<i>T. theileri</i>	<i>CatL</i>	TthCatL1 (CGTCTCTGGCTCCGGTCAAAC)	~273	5' to 95 °C	30" to 95 °C *	30" to 63 °C *	30" to 72 °C *	10' to 72 °C	[33,34]
		DT0155 (TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA)							
<i>Babesia</i> sp.	<i>18S rRNA</i>	PIRO A (AATACCCAATCCTGACACAGGG)	~400	5' to 94 °C	1' to 94 °C	1' to 61 °C	30" to 72 °C	5' to 72 °C	[18,35]
		PIRO B (TTAAATACACGAATGCCCCCAAC)							
<i>B. bovis</i>	<i>rap-1</i>	BoF (CACGAGGAAGGAACCTACCGATGTTGA)	~356	5' to 95 °C	1' to 95 °C	1' to 63 °C	30" to 72 °C	7' to 72 °C	[36,37]
		BoR (CCAAGGAGCTTCAACGTACGAGGTCA)							
<i>B. bigemina</i>	<i>hyp</i>	Bi1A (CATCTAATTTCTCTCCTACCCCTCC)	~278	5' to 95 °C	1' to 95 °C	1' to 60 °C	30" to 72 °C	7' to 72 °C	[38,39]
		Bi1B (CCTCGGCTTCAACTCTGATGCCAAAG)							
<i>A. marginale</i>	<i>msp5</i>	19A (GTTGTTCTGGGGTACTCCTA)	~715	5' to 94 °C	45" to 94 °C	30" to 64 °C	1' to 72 °C	10' to 72 °C	[40,41]
		19B (TGATCTGGTCAGCCCCAGCT)							

Legend: bp: base pairs; °C: degrees Celsius, ID: initial denaturation, D: denaturation, H: hybridization, E: extension, FE: final extension, ": minutes, ': seconds, \*: 45 cycles.

#### 2.4. CatL-PCR to detect *T. vivax*

The positive samples for ILO-PCR were run with CatL-PCR, using the TviCatL1 and DTO155 primers (Table 1) and the high-fidelity enzyme Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Waltham MA, USA). The reaction conditions were those established in previous studies [20,28]. PCR products were purified using the Wizard® SV Gel and Clean-Up System Kit (Promega, Madison WI, USA) and sent to MACROGEN (Seoul, Republic of Korea) for Sanger sequencing.

#### 2.5. Bioinformatic analysis

We assembled the CatL sequences obtained using the MacVector 18.6 program, and the consensus sequences were deposited in GenBank (Accession numbers for CatL type: PP872140, PP872141, PP872142, PP872143). The similarity of consensus sequences obtained was analyzed with the BLAST tool. In the MEGA11 software, we built a maximum parsimony tree using the consensus sequences and those from GENBANK. The sequences used from *T. vivax* were reported in different countries in America and Africa

#### 2.6. Statistical analysis

To identify possible explanatory variables associated with infection or coinfection with haematropic agents, the molecular test distribution was analyzed based on certain variables collected per animal or sampled farm. The Chi-squared test was used for univariate and multivariate analysis in animals (sex, age, breed). Fisher's exact test was used for farm-level analysis (farm type, livestock movement, separate sick cattle, change needles, pasture rotation, presence of vectors, presence of other domestic animals, presence of dead animals last year, presence of urine with blood, muscle tremors). The two-sample Wilcoxon rank-sum test was used for temperature variable analysis. Age was categorized for the analyses as follows: (1) 0–9 months, (2) 10–18 months, (3) 19–36 months, (4) >36 months. Analyses were performed using Stata SE 14.2 (Stata Corp, College Station, TX, USA). The statistical significance threshold was set at a  $p$ -value  $\leq 0.05$

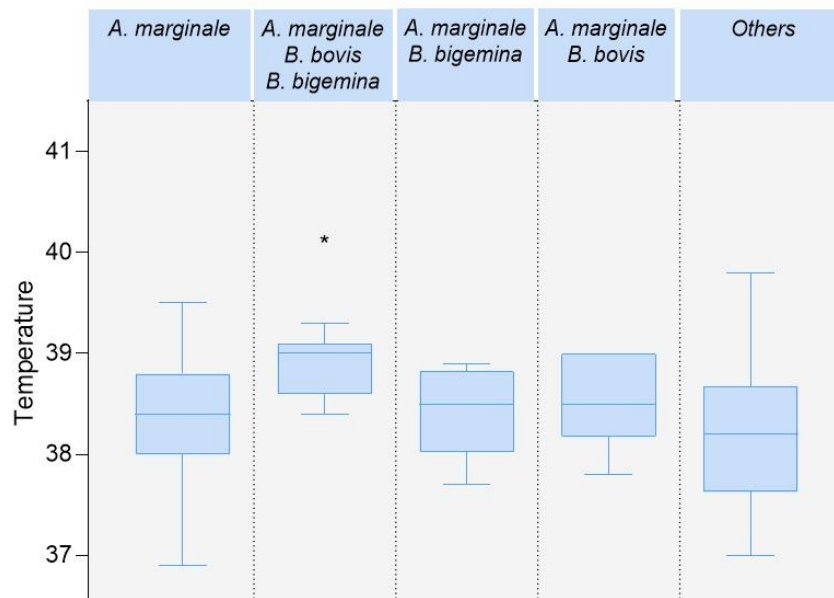
### 3. Results

In 2017, 170 cattle samples were collected from 19 farms located on Santa Cruz Island in the Galapagos in Ecuador. The results showed that 23.5% (40/170) of blood samples came from Bella Vista, 8.2% (14/170) from Puerto Ayora, and 68.2% (116/170) from Santa Rosa. Regarding the zootechnical characteristics of cattle, 92.9% (158/170) were females, and 7.1% (12/170) were males. In total, 62.9%

(107/170) belonged to the age category over 36 months, with an overall average age of 2.49 years ( $\pm 0.79$ ). The predominant bovine species was *Bos taurus*, with the following breeds: Simmental 45.9% (78/170), Brown Swiss 17.6% (30/170), Holstein 16.5% (28/170), 17.6% (30/170) were mixed breeds (*Bos taurus* and *Bos indicus*) and 2.4% (4/170) the race was not determined.

The prevalence of haemotropic agents molecularly identified at the farm level was as follows: *T. vivax* 42.1% (8/19), *B. bovis* 47.4% (9/19), *B. bigemina* 78.9% (15/19), *A. marginale* 100% (19/19). Regarding the prevalence per animal, no cases were observed for *T. vivax* and *B. bovis* in cattle sampled in Puerto Ayora. On the contrary, a high percentage (57.5%) of *A. marginale* was evident in Bellavista and the area in Puerto Ayora (71.4%) and Santa Rosa (69.8%). Prevalence at the animal level was 14.7% (25/170) to *T. vivax*. The presence of *T. evansi* and *T. theileri* could not be demonstrated in the cattle analyzed. However, the molecular tests revealed the presence of *B. bovis* at 11.2% (19/170) and *B. bigemina* at 14.7% (25/170). Table 2 presents the distribution of the farms and cattle sampled and the results of the molecular tests in the case of infections of haemotropic agents analyzed.

Among the haemotropic agents coinfections in the study, the most prevalent was *A. marginale* + *T. vivax* with 7.06% (12/170), while the lowest prevalence was *B. bovis* + *B. bigemina* and *T. vivax* + *B. bigemina* + *A. marginale* with 0.59% (1/170) Table 3. An important fact to highlight is the presence of four haemotropic agents on 26.3% (5/19) of the farms in Table 4. In addition, a significantly higher body temperature in cattle ( $n = 6$ ) with the coinfection including *A. marginale*, *B. bovis* and *B. bigemina* was observed (two-sample Wilcoxon rank-sum test;  $p$ -value = 0.047). Figure 2 shows the distribution of temperature in animals with anaplasmosis and coinfections.



**Figure 2.** Box plot of the temperature distribution by type anaplasmosis and coinfections.

Table 5 presents the distribution of cattle sampled and positive results of molecular diagnostic tests applied to identify haemotropic agents, considering the zootechnical parameters: sex, age, and breed. A higher prevalence was found in males ( $n = 12$ ), which could be observed in *B. bovis* (25%), *B. bigemina* (50%), and *A. marginale* (75%). The highest prevalence was also found for all haemotropic agents in the category of age from 10 to 18 months ( $n = 16$ ) as observed for *T. vivax* (25%), *B. bovis* (50%), *B. bigemina* (56.3%) and *A. marginale* (93.8%). About the breed, the highest prevalence could be observed in crossbreed cattle ( $n = 30$ ) for *B. bovis* (16.7%), *B. bigemina* (26.7%), and *A. marginale* (93.3%), while *T. vivax* has a prevalence of 23.3% and was observed in Brown Swiss breed. The statistical analysis could not show a significant difference (Chi2 test;  $p$ -value  $> 0.05$ ) in the distribution of positive samples depending on the zootechnical parameters

Table 6 shows the distribution of positive results to the diagnostic tests, depending on the different sanitary management parameters observed in farms. The statistical analysis could not show a significant difference (Fischer' exact test;  $p$ -value  $> 0.05$ ) in the distribution of positive samples depending on the sanitary management parameters applied in farms. Regarding the general aspects of animal husbandry, the sampled farms were mostly mixed production (84.2%), the cattle were moved to other areas on the same island (57.9%), separated cattle when they were considered sick (84.2%), change needles when applying medications or vaccines (57.9%), and rotation of pastures (73.7%). In addition, 76.5% of farms reported the presence of ticks on cattle, and 68.4% reported their existence in other animals such as pigs, horses, poultry, goats, and dogs. The farms' owners reported sudden deaths in cattle in the last year (31.6%), the presence of haematuria (10.5%), and muscle tremors (5.3%). Farms positive for *T. vivax* were significantly more associated with the presence of other domestic animal (Fischer's exact test;  $p$ -value = 0.04).

Positive samples ( $n = 4$ ) for *CatL*-PCR were sequenced, showing a quality of over 95% when assembled. The sequences obtained were compared with other sequences ( $n = 16$ ) found in the GenBank from 10 different countries. The dendrogram (Figure 2) shows a defined clade to *T. vivax* that confirms that the sequences of *T. vivax* from the Galapagos (G149, G137, G150, and G167) are joined with sequences from different countries in South America and Africa. A 100% similarity can be observed with the strains found in cattle from Ecuador, Brazil, Venezuela, Ghana, Burkina Faso, Colombia and Nigeria. The dendrogram yielded a consistency index, retention index, and composite index of 0.812500, 0.900000, and 0.857143 (0.731250), respectively. The *T. theileri* sequence (OQ304110.1) was used as an outgroup of the tree (Figure 3).

**Table 2. Distribution of prevalence and coinfections of *T. vivax*, *Babesia* spp. and *A. marginale* in the three sectors of Santa Cruz-Galapagos Island**

Unique infections	Bella Vista		Puerto Ayora		Santa Rosa		Total	
	Farm (n=4)	Cattle (n=40)	Farm (n=2)	Cattle (n=14)	Farm (n=13)	Cattle (n=116)	Farm (n=19)	Cattle (n=170)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>T. vivax</i>	3 (75)	7 (17.5)	0	0	5 (38.5)	18 (15.5)	8 (42.1)	25 (14.7)
<i>Babesia</i> spp.	3 (75)	6 (15)	2 (100)	2 (14.3)	11 (84.6)	26 (22.4)	16 (84.2)	34 (20)
<i>B. bovis</i>	1 (25)	4 (10)	0	0	8 (61.5)	15 (12.9)	9 (47.4)	19 (11.2)
<i>B. bigemina</i>	3 (75)	4 (10)	2 (100)	2 (14.3)	10 (76.9)	19 (16.4)	15 (78.9)	25 (14.7)
<i>A. marginale</i>	4 (100)	23 (57.5)	2 (100)	10 (71.4)	13 (100)	81 (69.8)	19 (100)	114 (67.1)

**Table 3. Details of coinfections of *T. vivax*, *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* in cattle from Santa Cruz, Galapagos Island.**

<i>T. vivax</i> Da-PCR	<i>B. bovis</i> rap-1-PCR	<i>B. bigemina</i> hyp-PCR	<i>A. marginale</i> msp5-PCR	Total (No. %)
-	-	-	-	42 (24.7)
-	-	-	+	75 (44.1)
-	-	+	-	3 (1.8)
-	-	+	+	11 (6.5)
-	+	-	-	3 (1.8)
-	+	-	+	3 (1.8)
-	+	+	-	1 (0.6)
-	+	+	+	7 (4.1)
+	-	-	-	7 (4.1)
+	-	-	+	12 (7.1)
+	-	+	+	1 (0.6)
+	+	-	+	3 (1.8)
+	+	+	+	2 (1.2)
				n = 170

**Table 4. Presence and distribution of *T. vivax*, *B. bovis*, *B. bigemina* and *A. marginale* on farms on Santa Cruz, Galapagos Island.****Cruz, Galapagos Island.**

<i>T. vivax</i> Da-PCR	<i>B. bovis</i> rap-1-PCR	<i>B. bigemina</i> hyp-PCR	<i>A. marginale</i> msp5-PCR	Total (No. %)
-	-	-	+	2 (10.5)
-	-	+	+	5 (26.3)
-	+	-	+	1 (5.3)
-	+	+	+	3 (15.8)
+	-	-	+	1 (5.3)
+	-	+	+	2 (10.5)
+	+	+	+	5 (26.3)
				n = 19

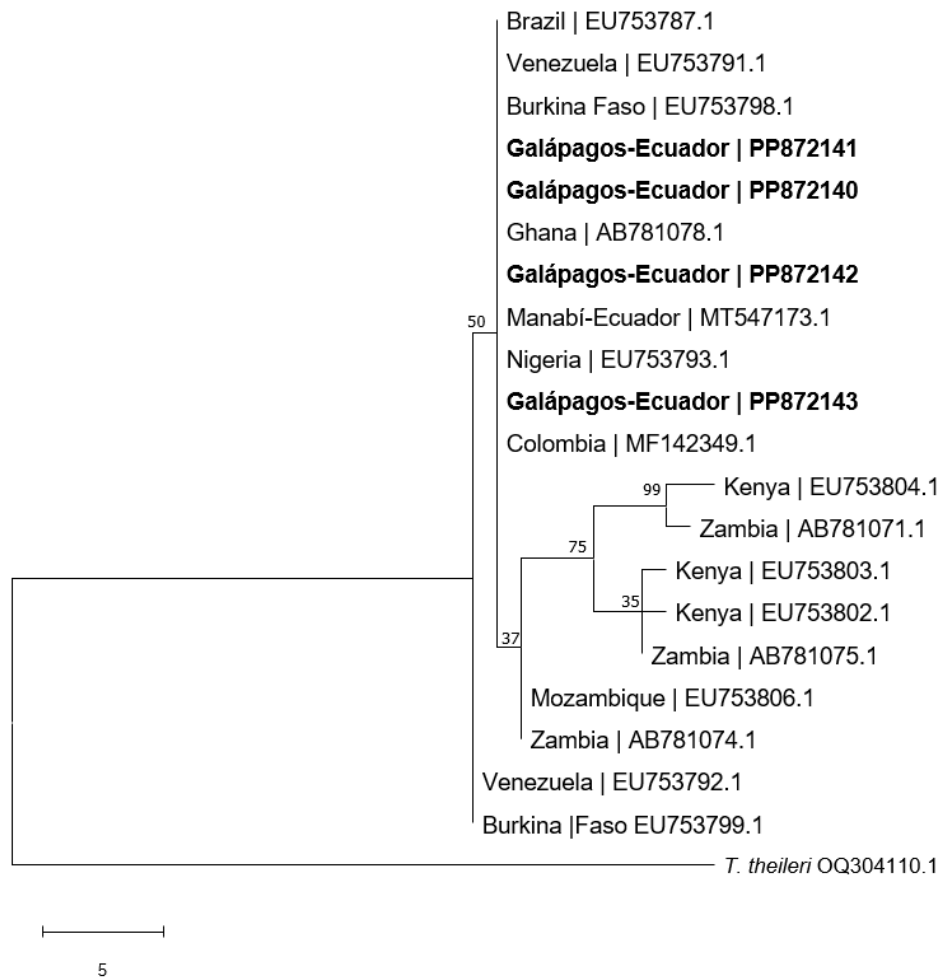
**Table 5. Distribution of animals and positive results from molecular tests, based on zootechnical parameters of bovines analyzed in Santa Cruz-Galapagos Island**

Explanatory variable	Modalities	N° Animals sampled (%)	<i>T. vivax</i>	<i>Babesia</i> spp.	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale msp5</i> -PCR
			<i>Da</i> -PCR n (%)	<i>18S rRNA</i> -PCR n (%)	<i>rap-1</i> -PCR n (%)	<i>hyp</i> -PCR n (%)	n (%)
<b>Sex</b>	Male	12 (7.1)	1 (8.3)	6 (50)	3 (25)	6 (50)	9 (75)
	Female	158 (92.9)	24 (15.2)	28 (17.7)	16 (10.1)	19 (12)	105 (66.5)
<b>Age</b>	0-9 months	5 (3)	0	3 (60)	1 (20)	2 (40)	5 (100)
	10-18 months	16 (9.4)	4 (25)	10 (62.5)	8 (50)	9 (56.3)	15 (93.8)
	19-36 months	39 (22.9)	6 (15.4)	9 (23.1)	4 (10.3)	6 (15.4)	33 (84.6)
	>36 months	107 (62.9)	15 (14)	12 (11.2)	6 (5.6)	8 (7.5)	59 (55.1)
	ND	3 (1.8)	0	0	0	0	2 (66.7)
<b>Breed</b>	Cross-breed	30 (17.6)	3 (10)	10 (33.3)	5 (16.7)	8 (26.7)	28 (93.3)
	Holstein	28 (16.5)	3 (10.7)	2 (7.1)	0	2 (7.1)	16 (57.1)
	Brown Swiss	30 (17.6)	7 (23.3)	6 (20)	4 (13.3)	5 (16.7)	17 (56.7)
	Simmental	78 (45.9)	12 (15.4)	15 (19.2)	10 (12.8)	9 (11.5)	50 (64.1)
	ND	4 (2.4)	0	1 (25)	0	1 (25)	3 (75)

Legend: ND: not determined.

**Table 6. Distribution of farms and positive results from molecular tests depending on sanitary management parameters used in farms of the Santa Cruz, Galapagos Island.**

Explanatory variable	Modalities	Total Farms (%)	<i>T. vivax</i>	<i>Babesia</i> spp.	<i>B. bovis</i>	<i>B. bigemina</i>	<i>A. marginale</i>
			<i>Da</i> -PCR	<i>18S rRNA</i> -PCR	<i>rap-1</i> -PCR	<i>hyp</i> -PCR	<i>msp5</i> -PCR
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Production system	Meat	3 (15.8)	1 (33.3)	2 (66.7)	1 (33.3)	2 (66.7)	3 (100)
	Mixed	16 (84.2)	7 (43.8)	14 (87.5)	8 (50)	13 (81.3)	16 (100)
Livestock movement	No	8 (42.1)	5 (62.5)	7 (87.5)	6 (75)	7 (87.5)	8 (100)
	Yes	11 (57.9)	3 (27.3)	9 (81.8)	3 (27.3)	8 (72.7)	11 (100)
Separate sick cattle	No	5 (26.3)	2 (40)	4 (80)	2 (40)	4 (80)	5 (100)
	Yes	14 (84.2)	6 (42.9)	12 (85.7)	7 (50)	11 (78.6)	14 (100)
Change needles	No	9 (47.4)	4 (44.4)	8 (88.9)	3 (33.3)	7 (77.8)	9 (100)
	Yes	10 (57.9)	4 (40)	8 (80)	6 (60)	8 (80)	10 (100)
Pasture rotation	No	4 (21.1)	2 (50)	3 (75)	3 (75)	3 (75)	4 (100)
	Yes	15 (73.7)	6 (40)	13 (86.7)	6 (40)	12 (80)	15 (100)
Presence of vectors	Ticks	13 (76.5)	7 (53.8)	12 (92.3)	6 (46.2)	12 (92.3)	13 (100)
	Ticks and flies	4 (23.5)	0	3 (75)	2 (50)	2 (50)	4 (100)
Presence of other domestic animals	No	6 (31.6)	1 (16.7)	5 (83.3)	2 (33.3)	5 (83.3)	6 (100)
	Yes	13 (68.4)	7 (53.9)	11 (84.6)	7 (53.8)	10 (76.9)	13 (100)
Presence of dead animals last year	No	12 (63.2)	5 (41.7)	11 (91.7)	7 (58.3)	10 (83.3)	12 (100)
	Yes	6 (31.6)	2 (33.3)	4 (66.7)	1 (16.7)	4 (66.7)	6 (100)
Presence of urine with blood	No	17 (89.5)	7 (41.2)	14 (82.4)	7 (41.2)	13 (76.5)	17 (100)
	Yes	2 (10.5)	1 (50)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
Muscle tremors	No	18 (94.7)	8 (44.4)	15 (83.3)	8 (44.4)	14 (77.8)	18 (100)
	Yes	1 (5.3)	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)



**Figure 1.** Maximum Parsimony tree of the Cathepsin gene of *Trypanosoma vivax* with sequences available in GenBank from different countries. Legend: G149, G137, G150 and G167: sequences obtained in this study from the Galapagos Islands, Ecuador. *Trypanosoma theileri* sequence OQ304110.1 was used as an outgroup of the tree.

## 4. Discussion

### 4.1. *Trypanosoma vivax*

This study demonstrated the presence of *T. vivax* in the province of Galapagos for the first time, with a prevalence of 14.7% in cattle. This finding was made possible by the use of a PCR, which has a high sensitivity and is considered the selected test for the detection of active infections to diagnose bovine trypanosomoses [42]. An analytical test of sensitivity and specificity of five primers showed that ILO 1264/1265 primers had the best results [28]. Another molecular marker was *CatL* gen, which reports a high sensitivity and specificity and has been widely used to study genetic diversity, allowing the comparison of isolates obtained in Galapagos with those from South America and Africa [2,4,30,43]. Our finding would imply the endemic status of *T. vivax* on Santa Cruz Island, but *T. evansi* and *T. theileri* were not found in the analyzed samples.

Dendrogram analysis of the isolates of *T. vivax* from the Galapagos Islands revealed a similarity to those found in continental Ecuador, and they are closely related to those reported in Brazil, Venezuela, Colombia, Burkina Faso, Ghana and Nigeria, (Figure 3). These findings suggest that in the Galapagos, *T. vivax* came from the continent, possibly from Ecuador itself, as has been found in other studies in South America, which indicate that the origin of this haemoflagellate is native to Africa [4,30,44,45].

Cattle (*Bos taurus*) were introduced to the Galapagos Islands during their colonization from mainland Ecuador, which began in 1832 with Floreana Island, followed by San Cristóbal in 1869 and Isabela in 1895. Santa Cruz Island was inhabited in the 1920s, and cattle arrived on the island after 1923 [46]. It is estimated that *T. vivax* was introduced into South America around 1830 through the importation of zebu cattle originating from Senegal, which entered mainly French Guiana and the French West Indies and dispersed throughout the rest of the continent [47]. Several mobilizations of cattle were carried out to the Galapagos Islands from different regions of continental Ecuador and between islands starting from colonization until 1999 when the Inspection and Quarantine System for Galapagos (SICGAL) was created to prevent the entry of exogenous species to the islands [21], this mobility probably favoured the entry of *T. vivax* and other haemotropic agents to the Galapagos.

The prevalence of *T. vivax* in this study was similar to the report in continental Ecuador by Chavez-Larrea et al. (2021), in the Quito slaughterhouse (13.3%), but higher than the prevalence in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas (3.7%) using TviCatL1-PCR [6]. The reported prevalence of *T. vivax* is concerning in endemic areas of South America, such as Brazil (state of Pará), where *T. vivax* infection rates detected by TviCATL-PCR were 24.6% [40]. However, it is higher than those found in the Caribbean and Orinoquia regions in Colombia, where the recorded prevalence was 0.2% [45] and 8.84% in the state of Goiás [3].

#### **4.2. *Anaplasma marginale***

In this study, the presence of *A. marginale* was also evidenced in cattle of Santa Cruz Island, which was present in all the farms analyzed, with a prevalence within the herd of 67.1%. However, this prevalence is lower than that found by Gioia et al. (2018) in cattle from the Isabela, Santa Cruz and San Cristobal islands (93.2%) [25]. In continental Ecuador it was reported in the province of Zamora Chinchipe the prevalence of *A. marginale* of 63.8% [48]. It was also lower than that described by Tana-Hernandez et al., of 86.1%, in a sampling carried out in the center of the country, specifically in the province of Santo Domingo de los Tsáchilas [40].

#### 4.3. *Babesia* spp.

Although the presence of *B. bigemina* was reported on the islands through the analysis of a pool of tick from Santa Cruz Island [25], the present work also allowed for the first report of *B. bovis* (11.2%) at the level of animals sampled on Santa Cruz Island, and confirm the presence of *B. bigemina* (14.7%) in cattle. Through 18S rRNA PCR, the presence of *Babesia* spp. was determined in 20% of the sampled cattle.

These haemotropic agents are present in bovine production systems and are considered endemic in South America, where prevalences of *A. marginale*, and *Babesia* spp. have been reported in 48.9% and 39.8%, respectively [1]. In Colombia, molecular tests revealed prevalences of 59.3%, 31.5%, and 13.8% to *A. marginale*, *B. bigemina*, and *B. bovis*, respectively [6]. In another study in the south of Minas Gerais in Brazil, a 100% seroprevalence was evident for *A. marginale* and *B. bovis* [49].

#### 4.4. Coinfections

Coinfections of haemotropic agents were also evaluated in this study, determining that the most common was *A. marginale* + *Babesia* spp with 15.9% and *Babesia* spp + *T. vivax* with 3.53%, this finding has been previously reported in South America according to Fetene et al. (2021), 26.1% of cattle had *A. marginale* + *Babesia* spp. coinfections [1]. In Colombia, coinfection infections were detected (*A. marginale* + *Babesia* spp. + *Trypanosoma* spp), with a presence of 53.9% in the cattle analyzed [45]. In continental Ecuador, coinfections were demonstrated in cattle: 18.1% had double infection (*A. marginale* + *T. theileri*), and 6% had triple infection: *A. marginale* + *B. bovis* + *B. bigemina* [9].

This study demonstrated a significant correlation between animals infected with triple co-infection (*T. vivax*, *A. marginale*, *Babesia* spp.) and hyperthermia, a characteristic clinical sign of the three diseases during parasitaemia in the acute stage of infections [5,11,12]. Studies have shown that *T. vivax* causes immunosuppression, so clinical signs intensify, mainly when concomitant diseases exist [50]. Coinfections and the pathogenicity of the causal agent, host susceptibility, and stress influence the presence of clinical signs associated with these haemotropic agents [2,3,47,51]. In the case of *Babesia* spp., it has been shown that the development of clinical manifestations in cattle could be a delayed, inadequate, or insufficient immune response due to poor adaptation between *Babesia* spp. species and their vertebrate hosts [52].

The high prevalence observed in Galapagos for *A. marginale* and *Babesia* spp. could be associated with the transmission routes of agents. In our study, 76.5% % of farms reported the presence of ticks on

livestock, probably *R. microplus* species, which has been reported in the Galapagos Islands, and also observed *A. marginale* and *B. bigemina* in these ticks [25], as well as in a research conducted in mainland Ecuador, which reported a 60% of *A. marginale* in *R. microplus* ticks, and a 6% prevalence of *A. marginale* in *Amblyomma cajennense* ticks [53]. Thus, *R. microplus* is an important vector due to its wide regional distribution.

On the other hand, 23% of the farms sampled in Santa Cruz claimed to observe blood-sucking flies, although in this study, the species of flies were not identified. It is possible they can be Tabanidae flies since these have been reported previously in Santa Cruz [54]. Tabanids' presence is associated with the prevalence and distribution of trypanosomoses, which has already been described in regions of America [6,15]. Iatrogenic transmission cannot be ruled out for *T. vivax* and *A. marginale* since 47.4% of the farms stated that they do not change the needle when administering vaccines or medications to cattle. This route has been associated with the presence of some outbreaks of *T. vivax* in Brazil [3,4] and transmission of *A. marginale* [55].

In the sampled farms, the presence of other domestic animals was evidenced as a risk factor for *T. vivax*. Some of them can harbor the parasite. This has been reported in different studies in South America, where *T. vivax* has been detected in goats, sheep, horses, buffalo, and deer [1]. In the Galapagos Islands, several species of domestic animals have been introduced during colonization apart from cattle. These species are found in wildlife conditions with the effort to reduce or eliminate their presence in the Islands, such as feral cat (*Felis silvestris catus*), feral dog (*Canis lupus familiaris*), feral donkey (*Equus asinus*), feral horse (*E. caballus*), feral pig (*Sus scrofa*), feral goat (*Capra hircus*) and Domestic sheep (*Ovis aries*) among others [46]. Although there is no record of the number of times these species were imported from the continent to the Islands during the colonization, *T. vivax* likely entered with ruminant species, which could be reservoirs. The dispersion of these haematropic agents in the Islands may be motivated by the mobility of local cattle; this could also be an essential factor related to the ticks' introduction in new areas where susceptible vertebrate host species are found [56]. In this context, the presence of wildlife and introduced animals in the Galapagos Islands can be an essential source of vector-transmitted infectious diseases, which has previously been evidenced by Pike et al. (2020), who found protozoans of the trypanosomatid family in the introduced parasitic fly *Philornis downi* that affects passerine birds [57].

Similarly, mobility in cattle has been associated with *T. vivax* outbreaks [2,4, 44] in free areas of the parasite. Although this study was carried out on one of the four Islands where cattle exist, in the Galapagos, the mobility of between areas within each island should be improved in future analyses of these haematropic agents.

The most populated Island in the Galapagos is Santa Cruz, covering 47% of the 755 agricultural productive units (APU) in the island province. Cattle are destined for meat production (61%) and dairy (49%), and mixed breeds are the most representative (80%). It is reported that in recent years, the Simmental breed has been introduced via artificial insemination for the genetic improvement of livestock [21].

Our study showed a difference in the distribution of positive cattle to *Babesia* spp. depending on the breed, in Holstein breed, the occurrence was 7.1% (2/38). It has been reported that both *Bos taurus* and *Bos indicus* are susceptible to *T. vivax* in Latin America [35], which can cause serious illness with infections by *Babesia* spp. and *A. marginale* [11], observing a possible resistance in pure individuals of *Bos indicus* that depends on the virulence of the agent [56]. Resistance to *B. bovis* has also been found in crosses of Hereford and Aberdeen Angus cattle (*Bos taurus*), finding the phenotypic frequency of 27.9%, showing in these animals tolerance to parasitism and low percentage of corpuscular volume (PCV) [59]. On the other hand, *Bos indicus* breeds resist ticks; some so-called Criollo breeds of Iberian origin distributed in South and Central America are also more resistant to *R. microplus* [60].

This study did not demonstrate a significant difference in the presentation of positive results depending on age for both *T. vivax* and *A. marginale*. However, it has been shown that the prevalence of *A. marginale* can increase with age, with mortality rates ranging from 50 to 60% in adults [10]. Further, there was a difference between the lower number of positive results for *Babesia* spp. depending on age over 36 months 11.2% (12/107). This has been shown in the case of *B. bovis*, animals over 36 months are less susceptible to infections by this parasite in Mexico [50]. The majority of cattle majority tested positive for *T. vivax* (25%), *Babesia* spp. (62.3%) and *A. marginale* (93.3%) were found in the 10 to 18-month category. In a study in the El Carmen area, a coastal area of the territory of Ecuador, 42.18% of the asymptomatic positive cattle for *Babesia* spp. belonged to the age group of 10 to 18 months [20]. In regions where ticks are abundant, like in the Galapagos Islands, young cattle exposed to haemotropic agents are more resistant to infection due to concomitant immunity [61].

## 5. Conclusions

The application of molecular techniques allowed the first demonstration of the presence of *T. vivax*, *B. bovis* and *B. bigemina* in cattle on Santa Cruz Island, a province of the Galapagos in Ecuador. In addition, a high prevalence of other haemotropic agents was found, such as *A. marginale* and *Babesia* spp., which may suggest an endemicity of these diseases on the island. Moreover, cattle with signs such as hyperthermia were associated with triple haemotropic coinfection. No *T. evansi* DNA was detected in the analyzed samples, which corresponds to the absence of this species in cattle in continental Ecuador. It was also found

that *T. vivax* infections were associated with other animal species on the farms, which suggests the importance of monitoring them since they can be possible reservoirs of several parasites on the island. These findings clarify epidemiological aspects of these diseases on Santa Cruz Island by generating updated scientific information, creating the basis for future control strategies formulation. These results could also be extrapolated and evaluated on the remaining islands of the archipelago where livestock activity exists. Therefore, livestock practices must consider a global epidemiological perspective (an island equal to a continent) and a conservationist perspective since islands host unique wild animal species worldwide.

### **Data Availability Statement**

Sample collection procedures were approved by the Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, MAE-DNB-CM-2017- 0073.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Author Contributions**

Conceptualisation, M.A.CH.L., A.R.B. and C.S.; methodology, M.A.CH.L., J.J.M, F.P.P.; A.F.M and A.R.B.; validation, M.A.CH.L., C.CH.I. and J.W.R.R.; formal analysis, M.A.CH.L., C.CH.I., E.M.Y.D. and C.S.; investigation, M.A.CH.L., C.CH.I., and E.M.; data curation, M.A.CH.L. and J.W.R.R.; writing the original paper, M.A.CH.L.; writing: and edition, M.A.CH.L., J.W.R.R., and C.S.; supervision, A.R.B. and C.S.; Project administration, J.W.R.R., C.CH.I. and C.S; acquisition of funding, J.W.R.R. and C.S., The authors read and accepted the published version of the manuscript.

### **Funding**

This work was supported by the Academy of Research and Higher Education (ARES, Belgium; <https://www.ares-ac.be/en/cooperation-au-developpement>; accessed on 1 August 2024) through the Research for Development Project entitled “Establishment of a Platform to support training and awareness, diagnosis and development of a control strategy for brucellosis and trypanosomoses in Ecuador” (acronym: BruTryp).

The biological samples used in this work were taken within the framework of activities of the linkage project financed by the University of the Armed Forces ESPE and Ministry of Agriculture and Livestock of Ecuador in Galapagos MAG-Galapagos: Diagnosis of parasitic diseases and good bovine management practices in the Santa Cruz, San Cristóbal and Isabela Islands – Galapagos..

### Acknowledgments

We would like to express our gratitude to Eco. Juan Carlos Guzmán, Director of the Ministry of Agriculture and Livestock in Galapagos (MAG-Galapagos), as well as to the Director of the Agency for Regulation and Control of Biosafety and Quarantine for Galapagos (ABG) Dra. Marilyn Cruz and their respective teams, for facilitating contact with the farmers and allowing the necessary work to be carried out on the farms for this study. We also wish to thank the students and professionals of the Universidad de las Fuerzas Armadas—ESPE, who participated in the fieldwork.

### References

1. Fetene E, Leta S, Regassa F, Büscher P. Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors*. 25 janv 2021;14(1):80.
2. Florentin A, Garcia Perez HA, Rodrigues CMF., Dubois EF, Monzón CM, Teixeira MMG. Molecular epidemiological insights into *Trypanosoma vivax* in Argentina: From the endemic Gran Chaco to outbreaks in the Pampas. *Transboundary Emerging Dis.* mai 2022;69(3):1364-74.
3. Bastos TSA, Faria AM, Madrid DMDC, Bessa LCD, Linhares GFC, Fidelis Junior OL, et al. First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 29 juin 2017;26(3):366-71.
4. Vieira OLE, Macedo LOD, Santos MAB, Silva JABA, Mendonça CLD, Faustino MADG, et al. Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 30 oct 2017;26(4):516-20.
5. Gonzatti MI, González-Baradat B, Aso PM, Reyna-Bello A. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/Huequera/Cacho Hueco. In: Magez S, Radwanska M, éditeurs. *Trypanosomes and Trypanosomiasis* [Internet]. Vienna: Springer; 2014 [cité 16 nov 2023]. p. 261-85. Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_11)
6. Chávez-Larrea MA, Cholota-Iza C, Cueva-Villavicencio J, Yugcha-Díaz M, Ron-Román JW, Rodríguez-Cabezas A, et al. Molecular identification of *Trypanosoma theileri* (Laveran, 1902) in cattle from two slaughterhouses in Ecuador and its relation with other haemotropic agents. *Front Vet Sci.* 23 juin 2023;10:1153069.

7. Aregawi, W.G.; Agga, G.E.; Abdi, R.D.; Büscher, P. Systematic Review and Meta-Analysis on the Global Distribution, Host Range, and Prevalence of *Trypanosoma Evansi*. *Parasites. Vectors* **2019**, *12*, 67. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>.
8. Ramírez-Iglesias, J.R.; Eleizalde, M.C.; Reyna-Bello, A.; Mendoza, M. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma Evansi* and *Trypanosoma Vivax* infections. *J. Parasites Dis.* **2017**, *41*, 450–458. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0826-x>.
9. Chávez-Larrea, M.A.; Cholota-Iza, C.; Cueva-Villavicencio, J.; Yugcha-Díaz, M.; Ron-Román, J.W.; Rodríguez-Cabezas, A.; Saegerman, C.; Reyna-Bello, A. Molecular Identification of *Trypanosoma Theileri* (Laveran, 1902) in Cattle from Two Slaughterhouses in Ecuador and Its Relation with Other Haemotropic Agents. *Front. Vet. Sci.* **2023**, *10*, 1153069. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1153069>.
10. Kocan, K.M.; De La Fuente, J.; Blouin, E.F.; Coetzee, J.F.; Ewing, S.A. The Natural History of *Anaplasma Marginale*. *Vet. Parasitol.* **2010**, *167*, 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>.
11. Bock, R.; Jackson, L.; De Vos, A.; Jorgensen, W. Babesiosis of Cattle. *Parasitology* **2004**, *129*, S247–S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>.
12. Rar, V.; Tkachev, S.; Tikunova, N. Genetic Diversity of *Anaplasma Bacteria*: Twenty Years Later. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *91*, 104833. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104833>.
13. Abdala, A.A.; Larriestra, A.J.; Signorini, M. Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Rev. Vet.* **2021**, *31*, 115. <https://doi.org/10.30972/vet.3124728>.
14. Seidl, A.; Dávila, A.M.; Silva, R.A. Estimated Financial Impact of *Trypanosoma Vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1999**, *94*, 269–272. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000200027>.
15. Osório, A.L.A.R.; Madruga, C.R.; Desquesnes, M.; Soares, C.O.; Ribeiro, L.R.R.; Costa, S.C.G.D. *Trypanosoma (Duttonella) Vivax*: Its Biology, Epidemiology, Pathogenesis, and Introduction in the New World—A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 1–13. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>.
16. Magri, A.; Galuppi, R.; Fioravanti, M. Autochthonous *Trypanosoma* spp. in European Mammals: A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes. *Pathogens* **2021**, *10*, 334. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030334>.
17. De La Cadena, E.; Camacho, M.; Vaca, F.; Enríquez, S.; Eleizalde, M.C.; Arrivillaga-Henríquez, J.; Mendoza, M.; Navarro, J.C.; Ramírez-Iglesias, J.R. Molecular Identification of *Trypanosoma Theileri* in

Cattle from the Ecuadorian Amazon. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* **2023**, *37*, 100824. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100824>.

18. Medina-Naranjo, V.L.; Reyna-Bello, A.; Tavares-Marques, L.M.; Campos, A.M.; Ron-Román, J.W.; Moyano, J.C.; Jarrín-Porras, E.C.; Sandoval-Morejón, E.D.; Chávez-Larrea, M.A. Diagnosis of hemotropic *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. by ELISAi and PCR techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Rev. Cient. Fac. Vet.* **2017**, *27*, 162–171.

19. Wells, E.A.; Betancourt, A.; Ramirez, L.E. Serological Evidence for the Geographical Distribution of *Trypanosoma Vivax* in the New World. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1977**, *71*, 448–449. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90055-4).

20. Chávez-Larrea, M.A.; Medina-Pozo, M.L.; Cholota-Iza, C.E.; Jumbo-Moreira, J.R.; Saegerman, C.; Proaño-Pérez, F.; Ron-Román, J.; Reyna-Bello, A. First Report and Molecular Identification of *Trypanosoma (Duttonella) Vivax* Outbreak in Cattle Population from Ecuador. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 2422–2428. <https://doi.org/10.1111/tbed.1390621>. Barrera V, Escudero L, Valverde M, Allauca J. Productividad y sostenibilidad de los sistemas de producción agropecuaria de las islas Galápagos-Ecuador. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP); 2019.

21. *Plan Galápagos Plan de Desarrollo Sustentable y Ordenamiento Territorial del Régimen Especial de Galápagos*; Plan Galápagos 2016: Puerto Baquerizo Moreno, Ecuador.

22. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos Ecuador INEC Censo Nacional Agropecuario 2000. <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuar>.

23. Rhea, S.; Camacho, B.E.; Amoriello, C.W.; Correa, M.; Lewbart, G.A.; Cruz, M.; Vélez, A.; Castillo, P.; Pairis-García, M. Assessing Livestock Production Practices on Small-Scale Multi-Species Farms Located on Floreana Island, Galápagos Islands. *Animals* **2023**, *13*, 686.

24. Barrera, V.; Escudero, L.; Valverde, M.; Allauca, J. *Productividad y Sostenibilidad de Los Sistemas de Producción Agropecuaria de Las Islas Galápagos-Ecuador*; Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP): Quito, Ecuador, **2019**

25. Gioia GV, Vinuesa RL, Marsot M, Devillers E, Cruz M, Petit E, et al. Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transboundary & Emerging Diseases*. 2018;65(5):1262-71.

26. Adams DJ, Rosenberg DE, Yirui H. Prevalence of vector-borne diseases in a sample of client-owned dogs on Santa Cruz in the Galápagos Islands: a pilot study. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2016;6:28-30.

27. Scheibel J, Garcia-Porta J, Quezada G, Ibáñez A. Phylogeography and prevalence of hemoparasites (Apicomplexa: *Eucoccidiorida*) in Galápagos marine iguanas, *Amblyrhynchus cristatus* (Reptilia: *Iguanidae*). *Animals* [Internet]. 2022 [cité 3 oct 2023];12(9). Disponible sur: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=20220245958&site=ehost-live>
28. Eleizalde MC, Gómez-Piñeres E, Ramírez-Iglesias JR, Mendoza M. 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. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. juill 2021;25:100594.
29. Masake RA, Majiwa PAO, Mooloo SK, Makau JM, Njuguna JT, Maina M, et al. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*. févr 1997;85(2):193-205.
30. Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes*. févr 2009;23(1):44-51.
31. Holland WG, Claes F, My LN, Thanh NG, Tam PT, Verloo D, et al. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*. mai 2001;97(1):23-33.
32. Braem C. Evaluation of DNA extraction methods and primersets for diagnosis of sleeping sickness. *UIA*; 1999.
33. Yokoyama N, Sivakumar T, Fukushi S, Tattiyapong M, Tuvshintulga B, Kothalawala H, et al. Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. *Vet Parasitol*. 30 janv 2015;207(3-4):335-41.
34. Rodrigues AC, Garcia HA, Ortiz PA, Cortez AP, Martinkovic F, Paiva F, et al. Cysteine proteases of *Trypanosoma* (Megatrypanum) *theileri*: Cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*. sept 2010;59(3):318-25.
35. Olmeda AS, Armstrong PM, Rosenthal BM, Valladares B, Del Castillo A, De Armas F, et al. A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*. sept 1997;67(3):229-34.
36. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*. 1 oct 1993;50(1):69-81.

37. Suarez CE, Palmer GH, Jasmer DP, Hines SA, Perryman LE, McElwain TF. Characterization of the gene encoding a 60-kilodalton *Babesia bovis* merozoite protein with conserved and surface exposed epitopes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. mai 1991;46(1):45-52.
38. Figueroa-Millán JV, Lira-Amaya JJ, Castañeda-Arriola R, Álvarez-Martínez JA, Takata C, Bautista-Garfias CR. Optimización de una prueba de PCR-RFLP para detección y diferenciación de *Babesia* sp en garrapatas *Rhipicephalus microplus*. *Entomología Mexicana*. 2014;1:978-83.
39. Figueroa JV, Chieves LP, Johnson GS, Buening GM. Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol*. oct 1992;30(10):2576-82.
40. Tana-Hernández L, Navarrete-Arroyo K, Ron-Román J, Reyna-Bello A, Chávez-Larrea MA. PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Vet Res*. déc 2017;13(1):392.
41. Reyna-Bello A, Cloeckert A, Vizcaíno N, Gonzatti MI, Aso PM, Dubray G, et al. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clin Diagn Lab Immunol*. mars 1998;5(2):259-62.
42. Desquesnes M, Gonzatti M, Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, et al. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites Vectors*. déc 2022;15(1):64.
43. Garcia Pérez HA, Rodrigues CMF, Pivat IHV, Fuzato ACR, Camargo EP, Minervino AHH, et al. High *Trypanosoma vivax* infection rates in water buffalo and cattle in the Brazilian Lower Amazon. *Parasitology International*. déc 2020;79:102162.
44. Bastos TSA, Faria AM, Couto LFM, Nicaretta JE, Cavalcante ASDA, Zapa DMB, et al. Epidemiological and molecular identification of *Trypanosoma vivax* diagnosed in cattle during outbreaks in central Brazil. *Parasitology*. oct 2020;147(12):1313-9.
45. Jaimes-Dueñez J, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM. 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*. janv 2018;249:30-42.
46. Phillips RB, Wiedenfled DA, Snell HL. Current status of alien vertebrates in the Galápagos Islands: invasion history, distribution, and potential impacts. *Biol Invasions*. févr 2012;14(2):461-80.
47. Desquesnes M. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. Paris: OIE; 2004. 174 p.

48. Guarnizo TRM, Alvarez DO, Díaz-Sánchez AA, Cabezas-Cruz A, Gutiérrez LZ, Marrero SM, et al. Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Ticks and Tick-borne Diseases*. mai 2020;11(3):101380.

49. Barbieri JDM, Blanco YAC, Bruhn FRP, Guimarães AM. Seroprevalence of *Trypanosoma vivax*, *Anaplasma marginale*, and *Babesia bovis* in dairy cattle. *Ciênc anim bras*. déc 2016;17(4):564-73.

50. Costa RVC, Abreu APM, Thomé SMG, Massard CL, Santos HA, Ubiali DG, et al. Parasitological and clinical-pathological findings in twelve outbreaks of acute trypanosomiasis in dairy cattle in Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. déc 2020;22:100466.

51. Suarez CE, Alzan HF, Silva MG, Rathinasamy V, Poole WA, Cooke BM. Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *International Journal for Parasitology*. févr 2019;49(2):183-97.

52. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res*. mars 2009;40(2):37.

53. Maya-Delgado A, Madder M, Benítez-Ortíz W, Saegerman C, Berkvens D, Ron-Garrido L. Molecular screening of cattle ticks, tick-borne pathogens and amitraz resistance in ticks of Santo Domingo de los Tsáchilas province in Ecuador. *Ticks and Tick-borne Diseases*. sept 2020;11(5):101492. 54. Buestán J, Navarrete R. Lista actualizada de Tabanos (Diptera: *Tabanidae*) del Ecuador. *REV ECUAT HIG MED TROP*. 2007;44(1).

55. Reinbold JB, Coetzee JF, Hollis LC, Nickell JS, Riegel CM, Christopher JA, et al. Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. *ajvr*. oct 2010;71(10):1178-88.

56. Léger E, Vourc'h G, Vial L, Chevillon C, McCoy KD. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Exp Appl Acarol*. 1 févr 2013;59(1):219-44.

57. Pike CL, Lincango MP, Causton CE, Parker PG. Trypanosomatids detected in the invasive avian parasite *Philornis downsi* (Diptera: *Muscidae*) in the Galapagos Islands. *Insects* [Internet]. 2020 [cité 3 oct 2023];11(7).

Disponible

sur:

<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=lah&AN=20203344841&site=ehost-live>

58. Bock R, De Vos A, Kingston T, McLELLAN D. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B bigemina* and *Anaplasma marginale*. *Aust Veterinary J*. mai 1997;75(5):337-40.

- 
59. Benavides MV, Sacco AMS. Differential *Bos taurus* cattle response to *Babesia bovis* infection. *Veterinary Parasitology*. nov 2007;150(1-2):54-64.
60. Guglielmo AA. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*. mars 1995;57(1-3):109-19.
61. Romero-Salas D, Mira A, Mosqueda J, García-Vázquez Z, Hidalgo-Ruiz M, Vela NAO, et al. Molecular and serological detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*. févr 2016;217:101-7.

**Molecular identification of *Trypanosoma vivax* (*Duttonella*) in potential hematophagous vectors from three regions of the mainland of Ecuador**

## **Etude 6 :**

# Section expérimentale

María Augusta Chávez-Larrea, Andrea Gaona-Quinde, Uwe Nickelsen-Cordovez, Jefferson Jumbo-Valencia, Cristina Cholota-Iza, Michelle Yugcha-Diaz, Fausto Bedoya-Páez, Jorge Ron-Román, Claude Saegerman, Sarah Martin-Solano, Armando Reyna-Bello

---

*En préparation*





## *Préambule*

Dans cette étude, des échantillons de mouches hématophages (n=11) et de bovins (n=301) ont été collectés dans trois contextes épidémiologiques: 1) à Chone dans la province de Manabí en région côtière, considérée comme une zone où *T. vivax* a été signalé, 6 spécimens de mouches ont été collectés ; 2) à Guayllabamba dans la province de Pichincha en région de la Sierra ou de l'Altiplano, considérée comme une zone apparemment indemne de trypanosomose bovine, où 2 spécimens ont été collectés ; et 3) à Tena dans la province de Napo en région amazonienne, où un foyer de trypanosomose bovine a été signalé par l'Agence de régulation et de contrôle phytosanitaire et zoosanitaire (AGROCALIDAD), 3 spécimens ont été collectés.

Les échantillons ont été analysés par PCR cathepsine (CatL) spécifique à *T. vivax*. Sur les 11 mouches une analyse moléculaire (PCR 18S et PCR COI) a été réalisée pour identifier la famille/le genre/l'espèce des mouches. Les résultats ont montré que 3 (17,65%) mouches étaient positives à la PCR. Les échantillons provenaient de Manabí (n=2) et de Pichincha (n=1). Selon l'arbre phylogénétique basé sur les séquences de type CatL, les 3 populations détectées dans les mouches équatoriennes de mouches sont étroitement liés aux isolats trouvés chez les bovins en Équateur. Des informations préliminaires sur la caractérisation des mouches sont disponibles à ce jour, des mouches de la famille Tabanidae (9) et *Stomoxys calcitrans* (2) ont été identifiées, les mouches positives pour *T. vivax* appartenaient à la famille Tabanidae. En revanche, les résultats obtenus à partir de l'analyse des bovins ont révélé une prévalence de *T. vivax* de 14,4% (26/180) à Chone – province de Manabí, 25,3% (19/75) à Guayllabamba – province de Pichincha et de 43,5% (20/46) à Tena – province de Napo. Une cause probable de la présence du foyer à Tena était la mobilité des animaux de la région côtière vers l'Amazonie. Cette étude présente la première identification moléculaire de *T. vivax* chez les mouches en Equateur, ce qui pourrait démontrer l'existence d'un vecteur potentiel de la maladie dans les zones étudiées.

**Molecular identification of *Trypanosoma vivax* (Duttonella) in potential hematophagous vectors from three regions of the mainland of Ecuador**

**María Augusta Chávez-Larrea<sup>1,2</sup>, Andrea Gaona-Quinde<sup>3</sup>, Uwe Nickelsen-Cordovez<sup>3</sup>, Jefferson Jumbo-Valencia<sup>4</sup>, Cristina Cholota-Iza<sup>2</sup>, Michelle Yugcha-Diaz<sup>2</sup>, Fausto Bedoya-Páez<sup>4</sup>, Jorge Ron-Román<sup>2</sup>, Claude Saegerman<sup>1</sup>, Sarah Martin-Solano<sup>2#</sup> and Armando Reyna-Bello<sup>4#\*</sup>**

<sup>1</sup> Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Sciences (UREAR-ULiège), Fundamental and Applied Research for Animal and Health (FARAH) Center, Department of Infections and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, 4000 Liège, Belgium; M.A.CH.L: machavezlarrea@student.uliege.be, C.S:claudesaegerman@uliege.be

<sup>2</sup> Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador, Grupo de Investigación en Sanidad Animal y Humana (GISAH), M.A.CH.L: machevez@espe.edu.ec C.CH.I: cecholota@espe.edu.ec E.M.Y: emyugcha@espe.edu.ec J.R.R: jwron@espe.edu.ec S.M.S: smartin@espe.edu.ec A.R.B: aareyna@espe.edu.ec.

<sup>3</sup> Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, Sangolquí, Ecuador, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, A.G.Q: apgaona@espe.edu.ec U.N.C: ujnicksen@espe.edu.ec.

<sup>4</sup> Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, Sede Santo Domingo, Ecuador, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, J.J.V: jeffer1996jj@gmail.com F.B.P: fvbedoya@espe.edu.ec A.R.B: aareyna@espe.edu.ec

# contributed equally to the work.

\* Corresponding Author: Armando Reyna-Bello, aareyna@espe.edu.ec; Telf: +593 99 847 7582  
Universidad de las Fuerzas Armadas, ESPE, Sede Santo Domingo, Ecuador, Grupo de Investigación en

Sanidad Animal y Humana (GISAH), Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

## Abstract

**Background** *Trypanosoma vivax* is a protozoan that affects cattle. In South America it occurs as epizootic outbreaks causing high mortality. In this continent, transmission occurs mechanically where haematophagous insects play an important role in its distribution. There is no information on the importance of vectors in the transmission of *T. vivax* in Ecuador. The present study aimed to identify *T. vivax* in Tabanidae flies collected in three regions of the country.

**Methods** Eleven flies collected in the provinces of Manabí (n=6), from the Coastal region; Pichincha (n=2) from the Highlands region and Napo (n=3) from the Amazon region. In addition, we collected 180, 75 and 46 blood samples originating from the same three provinces. A PCR-based assay was used to analyze the samples using primers specific for the *T. vivax*-encoded cathepsin L-like (CatL) proteinase. To identify the family, genus, and species of the flies collected, we used classical morphological identification keys and two polymerase chain reaction techniques (28S and COI). The PCR products obtained were sequenced and analyzed by BLAST. The sequences were used to construct a maximum parsimony tree using the MEGA11 programme.

**Results** Of the 11 specimens analysed 3 (27.2%) were PCR positive, the samples came from Manabí (n=2) and Pichincha (n=1). Molecular analysis of the flies identified them as belonging to the family Tabanidae and Muscidae. According to the phylogenetic tree based on CatL-like sequences, the 3 Ecuadorian isolates of *T. vivax* were discovered in Tabanidae flies from Manabí and Pichincha and are closely related to populations of *T. vivax* detected in Tabanidae flies found in cattle in Ecuador. The prevalence of *T. vivax* in cattle was 14.4% (26/180) in Manabí, 25.3% (19/75) in Pichincha and 43.5% (20/46) in Napo.

**Conclusions** This study presents the first molecular identification of *T. vivax* in Tabanidae flies in Ecuador by analysis of CatL-like sequences, establishing that these flies could be important vectors of *T. vivax* in cattle production systems.

**Keywords** Tabanidae, Muscidae, Trypanosomoses, *Trypanosoma vivax*, cattle, Ecuador.

## Background

Cattle within production systems can be affected by ectoparasites, such as haematophagous flies and ticks that can be potent vectors of many diseases caused by bacteria, viruses and parasites [1]. These ectoparasites can also cause direct losses due to their constant and painful biting behaviour [2,3]. One of the

important vector-borne diseases is trypanosomosis. This protozoan disease can affect a wide variety of animals such as mammals, birds, fish, amphibians and reptiles [4]. In tropical and subtropical South America, bovine trypanosomosis can be caused by *Trypanosoma vivax*, *T. evansi* and *T. theileri* [5]. The disease can occur as epizootic outbreaks, causing economic losses related to a drop in milk and meat production, and a high mortality rate of up to 50% [5,6].

*Trypanosoma vivax* is a parasite belonging to the "Salivarian" group of trypanosomatids, by inoculation through fomites originating from the feeding of the diptera. This fact gives this haemoflagellate the particularity of being transmitted by the tsetse fly in Africa, where it completes a partial cycle as the epimastigotes adhere to the wall of the feeding canal [4,7]. In South America, horseflies transmit *T. vivax* mechanically mainly of the family Tabanidae and by the Muscidae, *Stomoxys calcitrans* [8,9]. The latter strategy allowed *T. vivax* to spread across the continent [3,7]. In the African continent, mechanical transmission of the protozoan through horsefly bites has been also demonstrated, causing outbreaks in areas where tsetse flies are not present [10,11]. In the case of Central and South America, it has been shown that the transmission of bovine trypanosomoses, in addition to mechanical transmission by the vector, is associated with mechanical transmission through contaminated instruments and materials such as needles [12].

Tabanids are considered efficient vectors for the transmission of *Trypanosoma* spp., for example in Cameroon, an infection rate of up to 24.4% of tabanids has been described, showing the presence of *T. theileri*, *T. vivax* and *T. evansi* [13]. In Brazil, the presence of *T. evansi* has also been identified [10]. In fact, the infection rate of horseflies has been evaluated by Desquesnes et al. (2009), who demonstrated an incidence rate of mechanical transmission of *T. vivax* between 63% and 75% within 20 days [14].

Horseflies in livestock farming are associated with the pathogenic and mechanical effect they have on the host. When feeding, they use their jaws to cut the skin, causing skin lesions, blood loss, as well as behavioural disturbances in the host causing decreased feed intake, weight loss, exhaustion, and drop milk production [3,15].

The family Tabanidae belongs to the order Diptera, suborder Brachycera, with approximately 144 genera and 4.400 species [3]. These insects have a wide distribution in livestock areas as well as along streams, savannas and near forests in tropical and subtropical areas. They are usually present during the rainy season or dry season, but in some regions, they may be present throughout the year [5].

Ecuador is a megadiverse country per unit area within the Neotropical countries (7.7 species per 10.000 km<sup>2</sup>), and its continental territory is divided into three continental regions: Coast, Sierra and Amazonia. Ecuador's territory is conducive to the formation of optimal ecosystems for the development of horseflies, with

an estimated 198 species of horseflies throughout these regions, some of which have even been found at altitudes of 3.400 m above sea level [16].

The detection of pathogens in the vector can provide relevant information on the host-host relationship and animal reservoirs [12]. Since few studies have been conducted in Ecuador on the vectorial importance of horseflies in the transmission of diseases in cattle, the aims of the present study were to capture Tabanidae flies in three Ecuadorian regions, to detect and characterise the circulating *T. vivax* in tabanids.

## **Methods**

### **Study area, collection of blood samples and specimens**

This work is part of a project to monitor diseases caused by haematropic agents. The monitoring covers three areas of the country, the coast, the Amazon and the highlands. The area of Chone in the province of Manabí is located in the Ecuadorian Pacific coast, and has a tropical climate characterized by a rainy season (December to April) and a dry season (May to November), with an average temperature of 22-25°C and rainfall ranging from 60 mm to 2000 mm. The area of Tena is located in the Amazon, and has a humid tropical climate with average temperatures of 24-25°C, characterized by a great diversity of flora and fauna [19]. The area of Guayllabamba is located in the province of Pichincha, in the Ecuadorian highlands. It is a valley 25 km from the city of Quito (capital of Ecuador), at an altitude of 1890 m above sea level. It has a dry climate, with temperatures ranging from 18°C to 28°C [19], and its main activity is agriculture and tourism, with livestock production limited to small dairy farms.

In the coastal region (Chone-Manabí), an endemic area [17,18], we collected 6 specimens of flies and sampled a total of 180 blood cattle samples from 7 farms. Then, in the Amazon region (Tena-Napo), where an outbreak was notified, 2 specimens of flies and 46 blood samples from cows were collected from 2 farms (Figure 1). Finally, in the Highland (Guayllabamba-Pichincha), an area apparently free of bovine trypanosomoses, we collected 3 specimens of flies and sampled 75 cows from 4 farms.



**Figure 1.** Collection sites of flies and cattle in the 3 regions of continental Ecuador.

The flies were collected using Nzi traps Flies and for the morphological identification of the fly specimens, the entomological keys according to Zumpt, F. 1973 [37] for Diptera: Muscidae and Falck M. 2014 for Diptera, Tabanidae [19] were used, to identify specimens belonging to the family Tabanidae. Specimens were considered to belong to the family Tabanidae if they had the following characteristics: a) prominent compound eyes, b) short antennae consisting of three segments, c) flattened body, d) characteristic wing of Tabanidae with one distal cell and five marginal cells. Each specimen of the family Tabanidae was preserved in 50 ml Falcon® tubes containing 95% ethanol at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Blood sample collection**

By puncturing the coccygeal vein of the tail, a blood sample (4 mL) was collected from each bovine in a BD Vacutainer® tube with the anticoagulant K2 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). The tubes were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  before use.

### **Packed Cell Volume (PCV) Analysis**

The capillary tubes were centrifuged at 9,000 rpm for 5 minutes in a micro haematocrit capillary, following which the packed cell volume (PCV) was determined.

### **DNA extraction from *Trypanosoma* sp. in flies**

DNA extraction was performed using the whole fly body, for which the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin, USA) was used according to the manufacturer's instructions (Animal Tissue - Mouse Tail section). Specific modifications were incorporated into the protocol: a) samples were digested at 55°C for three hours, b) to digest contaminating RNA, 6 µL of RNAsa was added to the lysate and incubated at 37°C for 30 min.

DNA integrity was checked on a 0.8 % agarose gel, DNA quality and concentration was measured by UV spectrophotometry using the Multiskan Sky High kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

### **DNA extraction from *Trypanosoma* sp. in cattle**

The extraction of DNA from bovine blood was conducted using the GeneJET Whole Blood Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). The integrity of the DNA was evaluated through analysis on a 0.8% agarose gel, and its quantity was determined through UV spectrophotometry, employing the Multiskan Sky High kit (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

### **Detection de *T. vivax* in flies and cattle**

The presence of *T. vivax* in specimens of the family Tabanidae was demonstrated by a specific CATL-like endpoint PCR. The primers TviCatL1 5'-GCCATCGCCAAGTACCTCGCCGA-3' and DTO155 5'-TTAAAGCTTCCACGAGTTCTTGATGATCCAGTA- 3 described by Cortez et al. [20] were used. Reagent concentrations and reaction conditions were as detailed by Chávez-Larrea et al. 2021 [18].

CATL-like positive PCR products were purified with the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA) and sent for sequencing in triplicate (forward and reverse) by the Sanger technique to Macrogen (Seoul, Korea).

### Molecular identification of flies

For the flies molecular identification, regions of the 28S and COI genes were amplified by PCR assay, using the primers 28K (5'-GAAGAGCCGACATCGAAG-3') and rc28F (3'-GTGATTTCTGCCAGTGCTCTG-3'), and TY-J-1460 (5'-TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC-3') and C1-N-2329 (5'-ACTGTAAATATATGATGAGCTCA-3'), respectively [21]. The reaction conditions and reagent concentrations described by Lessard et al. [21] were used as a reference to perform PCRs, with some modifications.

For the 28S gene, the thermocycler was set to the following conditions: an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 33 cycles of denaturation at 93°C for 30 s, annealing at 60°C for 1 min, elongation at 72°C for 1.5 min, and a final elongation at 72°C for 5 min. The reagent concentrations included Precision™ DNA Polymerase (Applied Biological Materials, Richmond, Canada) at 1.5 U, 0.5 µM of each primer, 2.5 mM of MgSO<sub>4</sub>, 0.8 mM of dNTPs, and 25 ng of DNA.

Similar conditions were used for the COI gene, with some adjustments: amplification cycles were set to 35 cycles, annealing temperature to 51°C, Taq concentration to 0.5 U, and the primers concentration at 0.25 µM.

The PCR products were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System and were sent for sequencing in triplicate (forward and reverse) using the Sanger technique at Macrogen."

### Bioinformatic analysis

The sequences obtained were assembled using the MacVector 18.6 program and the consensus sequences were deposited in GenBank. The similarity of these sequences for CatL-like was analysed in the BLAST tool. Using the MEGA11 program, a maximum parsimony phylogram (1000 Bootstrap and Tree-Bisection-Regrafting) was constructed with the sequences obtained in the present study and sequences available in GenBank. The sequences used from GenBank were from *T. vivax*, *T. theileri*, *T. evansi*, which were reported from different countries and different hosts. *Leishmania chagasi* was set as the outgroup.

### Data analysis

In order to classify cattle, the PCV was considered to be low when the reading was ≤ 24%, and normal when it fell between 25 and 46%. Regarding body temperature, a normal range was established between 37.8 and 39.2 degrees Celsius, as outlined by Rockett and Bosted (2007).

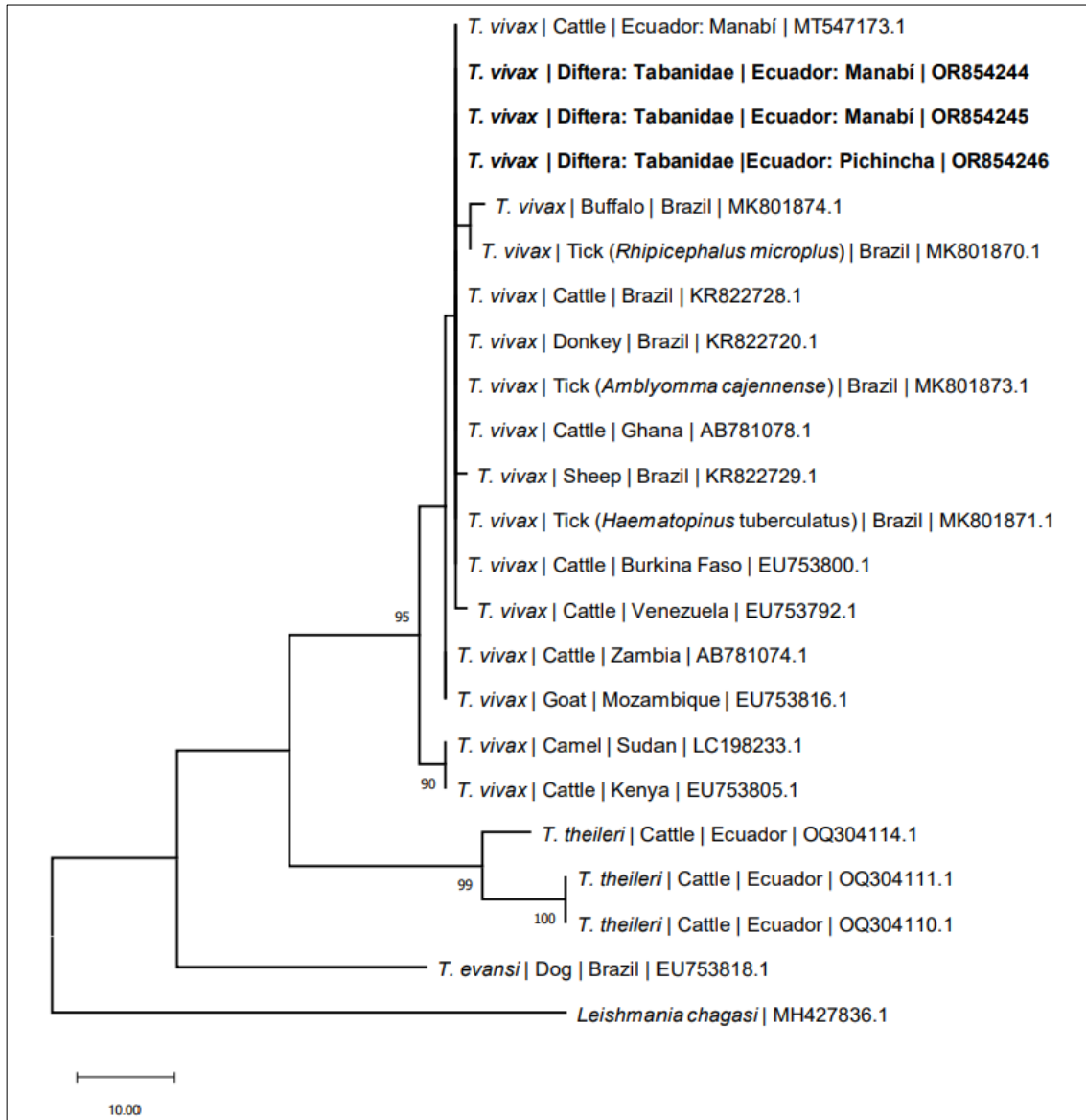
The discrepancy in the distribution of positive CRCP test results in animals according to haematocrit and temperature was evaluated using a two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test. A logistic regression analysis was used to examine the relationship between the variables zone, sex, and age. All tests were conducted using Stata SE 14.1® (StataCorp LP, College Station, TX, USA). A p-value of less than 0.05 was used to indicate statistical significance.

## Results

A *T. vivax* DNA band with a molecular weight of 180 bp was evidenced in 3 (27.2%) of the 11 specimens of flies analysed by CatL-like PCR gene. The samples came from the provinces of Manabí (n=2) and Pichincha (n=1). A total of 20 sequences from 9 countries were obtained from the GenBank. The three positive sequences sent for sequencing had a quality higher than 95% once cleaned and assembled.

The phylogram constructed (Figure 2) shows a defined clade for *T. vivax*. In one of the sub-clades it is evident that *T. vivax* sequences from Tabanidae Ecuador (Pichincha and Manabí) cluster with *T. vivax* sequences from different hosts and different countries in Africa and South America.

It is also evident that there is 100% identity with strains from Ecuador (in Cattle), Brazil (in *Equus*, in *Asinus*, in *Haemotopinus tuberculatus*, and in Cattle), Burkina Faso (in Cattle) and Ghana (in Cattle) (Figure 2). The phylogram constructed yielded a consistency index, retention index and composite index of 0.820000, 0.844828 and 0.750958, respectively.



**Figure 2.** Maximum Parsimony phylogram constructed with the consensus sequences of the CatL gene of *T. vivax* (1000 Bootstrap and Tree-Bisection-Regrafting), obtained from specimens of Tabanidae from Ecuador. *Leishmania chagasi* is set as an outgroup.

Of the 11 sequences obtained from the flies collected, nine were identified by BLAST as belonging to the family Tabanidae, of which three belonged to the genus *Tabanus* sp. from the Chone-Manabí area, one to the species *Tabanus hirtitibia* from the Guayllabamba area and one to the species *Dasychela macintyreii* from the Tena area. The remaining two flies were of the species *Stomoxys calcitrans* (Muscidae) from the Chone-Manabí area (Table 1).

**Table 1.** Family, genus or genus species suggested based on the analysis of the percentage identity of the 18S gene and COI, with information available in the BLAST tool.

Sample coding	28S Gen		COI Gen		Suggested Family/Genus/Species
	Genus/Species	% identity	Genus/Species	% identity	
<b>Manabí (n=6)</b>					
Ta-001	<i>Tabanus hirtitibia</i> (KM243474.1)	99.73%			<i>Tabanus</i> sp.
	<i>Tabanus superjumentarii</i> (K243479.1)	99.20%			
	<i>Tabanus abdominalis</i> (KM243469.1)	99.20%			
Ta-002	<i>Stomoxys calcitrans</i> (KC177824.1)	100%			<i>Stomoxys calcitrans</i>
Ta-003	<i>Stomoxys calcitrans</i> (KC177824.1)	99.20%			<i>Stomoxys calcitrans</i>
	<i>Stomoxys calcitrans</i> (XR_009398733.1)	99.20%			
Ta-004	<i>Poeciloderas quadripunctatus</i> (KM243452.1)	99.87%			Tabanidae
	<i>Tabanus superjumentarius</i> (KM243479.1)	99.74%			
	<i>Tabanus abdominalis</i> (KM243469.1)	99.74%			
	<i>Tabanus subsimilis</i> (DQ415541.1)	99.61%			
	<i>Tabanus pellucidus</i> (KM243478.1)	99.36%			
	<i>Tabanus birmanicus</i> (KM243472.1)	99.36%			
a-013*			<i>Poeciloderas quadripunctatus</i> (KM243546)	94.56%	Tabanidae
			<i>Tabanus</i> sp. (OM607086.1)	94.83%	
			<i>Hybomitra</i> sp. (JF868996.1)	94.53%	
			<i>Tabanus simili</i> (KR657883.1)	94.38%	
			<i>Hybomitra</i> sp. (KM571899.1)	94.38%	
			<i>Tabanus</i> sp. (HQ982365.1)	94.22%	
			<i>Hybomitra epistates</i> (GU689940.1)	94.22%	

a-014*	<i>Poeciloderas quadripunctatus</i> (KM243546)	94.55%	Tabanidae
	<i>Tabanus</i> sp. (OM607086.1)	94.83%	
	<i>Hybomitra</i> sp. (JF868996.1)	94.53%	
	<i>Tabanus</i> sp (KT116355.1)	94.52%	
	<i>Tabanus simili</i> (KR657883.1)	94.38%	
	<i>Hybomitra</i> sp. (KM571899.1)	94.38%	
	<i>Tabanus</i> sp. (HQ982365.1)	94.22%	
	<i>Hybomitra epistates</i> (GU689940.1)	94.22%	
<b>Pichincha (n=2)</b>			
a-007	<i>Poeciloderas quadripunctatus</i> (KM243452.1)	99.87%	Tabanidae
	<i>Tabanus superjumentarius</i> (KM243479.1)	99.74%	
	<i>Tabanus abdominalis</i> (KM243469.1)	99.74%	
	<i>Tabanus subsimilis</i> (DQ415541.1)	99.61%	
	<i>Tabanus pellucidus</i> (KM243478.1)	99.35%	
	<i>Tabanus birmanicus</i> (KM243472.1)	99.35%	
a-010*	<i>Tabanus hirtitibia</i> (KM243474.1)	99.48%	<i>Tabanus hirtitibia</i>
<b>Napo (n=3)</b>			
a-011	<i>Dichelacera regin</i> (KM243552.1)	90.61%	Tabanidae
	<i>Tabanus nigrovittatus</i> (KT381971.1)	90.52%	
	<i>Tabanus chrysurus</i> (NC_062705.1)	90.17%	
a-012	<i>Tabanus nigrovittatus</i> (KT381971.1)	89.98%	Tabanidae
	<i>Dichelacera regina</i> (KM243552.1)	9.98%	
Ta-008	<i>Dasychela macintyreii</i> (KM243413.1)	99.87%	<i>Dasychela macintyreii</i>

\*: Individuals positive for *T. vivax*

Of the total number of cattle tested in the Chone-Manabi, Guayllabamba-Pichincha and Tena-Napo areas, prevalences for *T. vivax* were found to be 14.4% (26/180), 25.33% (19/75) and 43.5% (20/46), respectively (Table 2).

Table 3 shows the distribution of animals by sex by zone, with a significant difference observed for females ( $p$ -value < 0.01). It should be noted that in the zone of Tena a higher number of males were sampled, which were transported from the province of Santo Domingo (coastal region) a few days before the outbreak. These animals were purchased for fattening. No association was found for the age and breed of the animals ( $p$ -value > 0.05).

PCV values ranged from 12 to 55% with an average of 29.82%. Two observations with PCV values of 10 and 58.5 were removed from the analysis as they were considered outliers. There was no association between low PCV and *T. vivax* positive animals ( $p$ -value > 0.05).

Regarding the distribution of *T. vivax* positive results according to animals with high temperature (above 39.2 °C) in the Napo area, a significant difference was observed ( $p$ -value = 0.02). The percentage of *T. vivax* positive animals with elevated temperature was 16% (4/25) and 61.54% (16/26) in Chone-Manabi and Tena-Napo, respectively. No *T. vivax* positive animals with high temperature were observed in Guayllabamba-Pichincha ( $p$ -value > 0.05).

**Table 2. Distribution of the prevalence of *T. vivax* in cattle, in the provinces of Manabi, Pichincha and Napo**

Farm (F) number	Total number of animals	N° animals sampled	Positives <i>T. vivax</i> PCR CatL-like n (%)
<b>Chone-Manabi</b>		<b>180</b>	<b>26 (14.4)</b>
F1	ND	30	0 (0.0)
F2	81	15	5 (33.3)
F3	66	52	16 (30.8)
F4	58	15	2 (13.3)
F5	175	20	2 (10)
F6	ND	39	1 (2.6)
F7	ND	9	0
<b>Guayllabamba-Pichincha</b>		<b>75</b>	<b>19 (25.3)</b>
F1	6	6	1 (16.7)
F2	12	12	8 (66.7)

---

F3	76	50	10 (20)
F4	ND	7	0
<b>Tena-Napo (foyer)</b>		<b>46</b>	<b>20 (43.5)</b>
F1	29	29	19 (65.5)
F2	17	17	1 (5.9)
<b>Total</b>		<b>301</b>	<b>65 (21.59)</b>

---

**Table 3. Distribution of samples according to sex, age and breed groups for bovine *T. vivax* in the three natural regions of Ecuador**

Variables	No. animals	Coastal Region		Sierra Region		Amazon Region	
		Chone-Manabí		Guayllabamba-Pichincha		Tena-Napo	
		Number of animals	Positives <i>CatL</i> PCR <i>T.vivax</i> n (%)	Number of animals	Positives <i>CatL</i> PCR <i>T.vivax</i> n (%)	Number of animals	Positives <i>CatL</i> PCR <i>T.vivax</i> n (%)
<b>Sex</b>							
Male	59	18	1 (5.6)	8	2 (25)	33	19 (57.6)
Female	190	110	9 (8.2)	67	17 (25.4)	13	1 (7.7)
ND	52	52	16 (30.8)	0	0 (0)	0	0 (0)
<b>Age</b>							
0-9 months	96	49	3 (6.1)	15	3 (20)	32	19 (59.4)
10-18 months	12	10	0 (0)	1	0 (0)	0	0 (0)
19-36 months	3	2	0 (0)	0	0 (0)	1	0 (0)
>36 months	4	1	1 (100)	1	1 (100)	2	1 (50)
ND	187	118	22 (18.6)	58	15 (25.9)	11	0 (0)
<b>Breed</b>							
Cross-breed	92	81	4 (4.9)	0	0 (0)	11	8 (72.7)
Bos taurus	96	18	0 (0)	75	19 (25.3)	3	1 (33.3)
Bos indicus	39	20	6 (30)	0	0 (0)	19	11 (57.9)
ND	74	61	16 (26.2)	0	0 (0)	13	0 (0)

## Discussion

The first evidence of *T. vivax* in cattle in Ecuador was obtained from an outbreak in the province of Manabí (Coast) [18]. Subsequently, a study conducted in slaughterhouses in the provinces of Santo Domingo de los Tsachilas (coastal region) and Pichincha (highland region) in Ecuador found a prevalence of *T. vivax* of 3.7% and 13.3%, respectively, this study showed that the positive animals from the slaughterhouses came from the provinces of Manabí, Santo Domingo and Sucumbíos [18].

After clarifying the prevalence of *T. vivax* in cattle in Ecuador, the demonstration of the possible role of horseflies of the family Tabanidae in transmission was one of the factors to be determined. The present study, for the first time, revealed the presence of *T. vivax* in 27,2% (3/11) of the insects from the provinces of Manabi and Pichincha. The presence of *T. vivax* in horseflies has already been reported in Colombia [22] and Brazil [23], highlighting the role of these vectors in the mechanical transmission of the protozoan in cattle. The finding in Ecuador could provide relevant information on the vector competency and possibly capacity of horseflies, particularly for the Latin American region.

The insects of the family Tabanidae, which are divided into three subfamilies: Pangoniinae, Chrysopsinae and Tabaninae [24], are found in different habitats such as savannas, riparian zones, coastal zones and forests. In our study, for the first time, flies of the family Tabanidae were found to be positive for *T. vivax*. This family is widespread in the Americas, as shown in Uruguay, where 77.6% of the collected specimens belonged to this family [25]. In Ecuador, 198 species, 30 genera, 5 tribes and 3 subfamilies have been described for the family Tabanidae, representing 16.3% of the Neotropical tabanid fauna, and about 2.1% of the Neotropical species are endemic [16]. Some studies have shown the presence of *Trypanosomes* spp. in several species of Tabanidae, confirming their competency and probable capacity for mechanical transmission; in Brazil, *T. evansi* DNA was detected in the alimentary tract of *Dichelacera alcicornis* and *Dichelacera januarii* [13]. Analysis of 1093 specimens of the family Tabanidae collected in three African countries identified 28 morphospecies and 26 genospecies belonging to six genera; this study also showed a 25% prevalence of *T. theileri* in the horseflies studied [26]. In a study in Burkina Faso, *T. vivax* was found in *Atylotus agrestis*, a tabanid which is widely distributed in the country [27].

The high species diversity of tabanids in Ecuador together with the uncontrolled local mobility of animals between different regions would favour the spread of endemic diseases [25]. A possible strategy for early detection of outbreaks could be the identification of pathogens in vectors.

The PCR used in this study amplified a fragment of the *T. vivax* CatL-like gene. Because of its high sensitivity, this molecular test has been used to detect *T. vivax* DNA in cattle during periods of low

or no parasitaemia [20]. Phylogenetic analysis of isolates found in Tabanidae flies in the present study in Pichincha and Manabí (Highland and Costa) showed similarity with isolates found in cattle in Manabí-Ecuador (Costa) [18]. The finding in Ecuador supports the hypothesis that the low genetic diversity of *T. vivax* isolates from Latin America may be related to the lack of genetic recombination that occurs in the tsetse fly in Africa [5,26]. The low genetic variability of *T. vivax* may favour periods of 3-5 years of enzootic disease in Latin America. These periods are free of symptoms in cattle, and may be interrupted by clinical epizootic outbreaks, which are influenced by vector density, the presence of high parasitaemia and infection of susceptible animals [5,27]. At this point, it is noteworthy that in the case of horseflies, the use of a nested 18S rRNA PCR allowed the detection of infection with other species such as *T. theileri* in horseflies in Africa [28] and Russia [29], and even the detection of fragments of the RoTat gene for *T. evansi* in tabanids in Brazil [13].

In Africa and Latin America, *T. vivax* has a wide range of hosts from ungulates to wildlife. It has been recorded in 39 countries and 47 mammalian species [30]. *T. vivax* does not cluster by specific geographical regions or hosts [26], although its size varies in its different hosts [8]. As it was shown in the phylogenetics analysis, *T. vivax* has a low genetic diversity in the CatL region between hosts and between regions. *T. vivax* sequences from South America are closer to those from West Africa as it has been previously observed [31].

In the present study, CatL-PCR analysis of cattle for *T. vivax* showed a prevalence of 14.4%, 25.33% and 43.5% in areas of Manabi, Pichincha and Napo provinces, respectively. In South America, combined estimates of *T. vivax* prevalence have been reported to be 6.4% [31], but in a livestock area in Argentina, prevalence of *T. vivax* was reported to be between 29% and 51% by TviCatL-PCR [33]. In contrast, a study in Ecuador reported a seroprevalence of 19.1% using the ELISA technique to detect IgG against *Trypanosoma* spp. in the coastal and Amazonian regions [34]. The variation of prevalences in the three areas of our study may be due to the different epidemiological contexts in which the sampling was carried out: in the case of Napo it was during an outbreak, while in the area of Guayllabamba located in the Sierra region, it was the first time that *T. vivax* was reported in cattle, and in Chone-Manabí it is an area where *T. vivax* has already been reported [18]. In Ecuador, as in other countries where transmission is strictly mechanical, the epidemiological conditions are such that periodic outbreaks occur every 3 to 5 years, subclinical for several years and then appearing drastically, or as a severe outbreak with the presence of clinical signs and high mortality in recently infected herds; this behaviour has been demonstrated at prevalences higher than 15% [14,23].

In the Guayllabamba area, the parasite was previously identified in a fly of the species *Tabanus hirtitibia*. Consequently, monitoring the disease in an area could be achieved by searching for the parasite in the vector. The factors that favour the appearance of the disease are influenced by the

abundance of vectors and the mobility of the animals [23]. This is evidenced by the outbreak in the Tena area of the Napo province in the Amazon region, where the presence of Tabanidae flies was detected, and it was found that the animals were transported from the coastal province of Santo Domingo. The movement of these animals could have been the triggering factor for the outbreak in this area. Conversely, the presence of *T. vivax*-positive flies in the areas of Chone and Guayllabamba may contribute to the maintenance and high prevalence of the parasite in these regions. Control of animal movements should be proposed as a mitigation measure of the spread of the disease across the country.

Furthermore, the study revealed the presence of *Stomoxys calcitrans* in the designated areas. These cosmopolitan flies are regarded as mechanical vectors of a number of microorganisms, including bacteria, viruses, protozoa and helminths, which are present in the blood and skin of animals such as cattle [9]. In Brazil, large populations of *Stomoxys calcitrans* have been observed in outbreaks of *T. vivax* in cattle farms [32,33], indicating the potential for this species to act as a vector for *T. vivax* in our study areas.

In Ecuador, the various studies on trypanosomiasis [17,18,34,35,36], have not found on farms any positive records in the province of Pichincha. This demonstrates the importance of this finding, as it is the first record of the pathogen in the highlands. In Ecuador, as in neighbouring countries, the continuous movement of animals from endemic areas would allow existing vectors from parasite-free areas to become sporadically contaminated. Integration of trypanosomiasis in the differential diagnostic of blood-borne pathogens should be advised in Pichincha province.

According to the study conducted in Ethiopia by Sheferaw et al (2019), the increased prevalence of *T. vivax* in cattle may be due to the higher density of flies of the genus *Stomoxys* and family Tabanidae (61%) compared to the density of flies of the genus *Glossina* spp. (39%) [11], so it is essential to properly assess the role of all vectors in the spread of *T. vivax* in a region. In Ecuador, where geographical zones (coastal, highland, Amazonian and island) can generate different epidemiological scenarios, a correct understanding of the problem is an essential starting point for the establishment of vector-borne disease prevention and control programmes.

## Conclusions

This study identified *T. vivax* for the first time in Tabanidae flies in Ecuador. Using PCR for the CatL-like gene, sequence analysis identified a 99% similarity to *T. vivax* from cattle found in Ecuador, indicating that these flies may also be important vectors in cattle production systems in Ecuador. The presence of Tabanidae flies in the three regions of Ecuador may represent an important vector for the

transmission of *T. vivax* in cattle, but also for other animal species that may play an important role in the epidemiology of the disease.

### **Acknowledgments**

We thank those who allowed the collection of the flies, as well as the students and professionals of the Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, who carried out the collection and conservation of the specimens.

### **Funding**

This work funded by the Academy of Research and Higher Education (ARES) through, the research and development of project entitled “Setting up a support platform for training and awareness, diagnosis and development of the brucellosis and trypanosomosis control strategy in Ecuador (acronym: BruTryp)”. The project was implemented by the University of the Armed Forces ESPE (Ecuador) and the University of Liège (Belgium).

### **Availability of data and materials**

The *Trypanosoma vivax* partial CatL-like gene DNA sequence datasets generated during the current study are available at GenBank in the NCBI repository, ACCESSION NUMBER: OR854244, OR854245, and OR854246.

### **Author Contributions**

Conceptualization, M.A.CH.L., A.R., C.S. and S.M.S.; methodology, M.A.CH.L.; validation, M.A.CH.L., C.CH.I. and J.R.R.; formal analysis, M.A.CH.L., C.CH.I., A.G.Q, U.N.C, J.J.V and F.B.P; investigation, M.A.CH.L., S.M.S. and A.R; data curation, M.A.CH.L., **E.M.Y.**; writing, M.A.CH.L.; revision and edition, S.M.S., A.R., J.R.R. and C.S.; supervision, S.M.S. and C.S.; project administration, J.R.R. AR and C.S.; funding acquisition, C.S., J.R.R. and A.R.

### **Ethics approval and consent to participate**

For the work in the farms, an informed consent letter was signed by the owner of the farm, in which the participation in the monitor of the hématropes agents in the cattle of the farm is requested, in the letter the following data: Name of the participant, identity letter number, place and date and signature.

### Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Institutional Review Board Statement: Sample collection procedures were approved by the Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica, MAATE (MAE-DNB-CM-2017- 0073).

### References

1. Behar A, Yasur-Landau D, Leszkowicz-Mazuz M. Vector-Borne Diseases in Ruminants. In: Shulman LM, éditeur. Infectious Diseases [Internet]. New York, NY: Springer US; 2023 [cité 13 nov 2023]. p. 441-68. (Encyclopedia of Sustainability Science and Technology Series). Disponible sur: [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2463-0\\_1095](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2463-0_1095)
2. Narladkar BW. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. *Vet World*. févr 2018;11(2):151-60.
3. Baldacchino F, Desquesnes M, Mihok S, Foil LD, Duvallet G, Jittapalapong S. Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infection, Genetics and Evolution*. déc 2014;28:596-615.
4. Magri A, Galuppi R, Fioravanti M. Autochthonous *Trypanosoma* spp. in European Mammals: A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes. *Pathogens*. 13 mars 2021;10(3):334.
5. Desquesnes M. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. Paris: OIE; 2004. 174 p.
6. Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, De Koning HP, Barrett MP. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*. déc 2016;143(14):1862-89.
7. Magez S, Pinto Torres JE, Oh S, Radwanska M. Salivarian Trypanosomes Have Adopted Intricate Host-Pathogen Interaction Mechanisms That Ensure Survival in Plain Sight of the Adaptive Immune System. *Pathogens*. 31 mai 2021;10(6):679.
8. Dávila AMR, Ramirez L. *Trypanosoma vivax* in the Americas: morphometry and host range. *Revue Elev Med Vet Pays trop*. 1998;51(1):29-35.

9. Baldacchino F, Muenworn V, Desquesnes M, Desoli F, Charoenviriyaphap T, Duvallet G. Transmission of pathogens by *Stomoxys* flies (Diptera, Muscidae): a review. *Parasite*. 2013;20:26.
10. Lendzele SS, Abah S, Nguetoum C, Burinyuy KA, Koumba AA, Mavoungou JF. Tabanid-transmitted animal trypanosomiasis in Cameroon: Evidence from a study in the tsetse free pastoral zone of Galim. *Parasite Epidemiology and Control*. août 2022;18:e00253.
11. Sheferaw D, Abebe R, Fekadu A, Kassaye S, Amenu K, Data D, et al. Prevalence of bovine trypanosomosis and vector density in a dry season in Gamo-Gofa and Dawuro Zones, Southern Ethiopia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. déc 2019;18:100343.
12. Desquesnes M, Gonzatti M, Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, et al. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites Vectors*. déc 2022;15(1):64.
13. Ramos CJR, De Souza Franco C, Da Luz SP, Marques J, De Souza KM, Do Nascimento LFN, et al. First record of *Trypanosoma evansi* DNA in *Dichelacera alcicornis* and *Dichelacera januarii* (Diptera: Tabanidae) flies in South America. *Parasites Vectors*. 5 janv 2023;16(1):4.
14. Desquesnes M, Biteau-Coroller F, Bouyer J, Dia ML, Foil L. Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal for Parasitology*. févr 2009;39(3):333-46.
15. Magez S, Radwanska M, éditeurs. *Trypanosomes and Trypanosomiasis* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2014 [cité 26 oct 2021]. Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1556-5>
16. Cárdenas RE, Buestán J, Dangles O. Diversity and distribution models of horse flies (Diptera: Tabanidae) from Ecuador. *Annales de la Société entomologique de France (NS)*. janv 2009;45(4):511-28.
17. Chávez-Larrea MA, Cholota-Iza C, Cueva-Villavicencio J, Yugcha-Díaz M, Ron-Román JW, Rodríguez-Cabezas A, et al. Molecular identification of *Trypanosoma theileri* (Laveran, 1902) in cattle from two slaughterhouses in Ecuador and its relation with other haemotropic agents. *Front Vet Sci*. 23 juin 2023;10:11.
18. Chávez-Larrea MA, Medina-Pozo ML, Cholota-Iza CE, Jumbo-Moreira JR, Saegerman C, Proaño-Pérez F, et al. First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transbound Emerg Dis*. juill 2021;68(4):2422-8.

19. Falck M. The Horse Flies (Diptera, Tabanidae) of Norway. *Noregian Journal of Entomology*. 2014;61:219-64.
20. Cortez AP, Rodrigues AC, Garcia HA, Neves L, Batista JS, Bengaly Z, et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America--characterization, relationships and diagnostic implications. *Mol Cell Probes*. févr 2009;23(1):44-51.
21. Lessard BD, Cameron SL, Bayless KM, Wiegmann BM, Yeates DK. The evolution and biogeography of the austral horse fly tribe Scionini (Diptera: Tabanidae: Pangoniinae) inferred from multiple mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. sept 2013;68(3):516-40.
22. Jaimes-Dueñez J, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM. 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*. janv 2018;249:30-42.
23. Batista JS, Moura GHF, Lopes FC, Paiva KARD, Araújo Júnior HND, Góis RCDS, et al. Risk factors for trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle raised in Rio Grande do Norte state. *Arq Inst Biol* [Internet]. 2 août 2018 [cité 20 sept 2023];85(0). Disponible sur: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1808-16572018000100201&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-16572018000100201&lng=en&tlng=en)
24. Mullens BA. Horse Flies and Deer Flies (Tabanidae). In: *Medical and Veterinary Entomology* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 12 sept 2023]. p. 327-43. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128140437000169>
25. Vinuesa RL, Durand B, Zanella G. Network analysis of cattle movements in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*. avr 2022;201:105608.
26. Osório ALAR, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LRR, Costa SCGD. *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. févr 2008;103(1):1-13.
27. Desquesnes M, Dia ML. *Trypanosoma vivax*: mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. *Experimental Parasitology*. janv 2003;103(1-2):35-43.

28. Votýpka J, Brzoňová J, Ježek J, Modrý D. Horse flies (Diptera: Tabanidae) of three West African countries: A faunistic update, barcoding analysis and trypanosome occurrence. *Acta Tropica*. sept 2019;197:105069.
29. Kostygov AYu, Frolov AO, Malysheva MN, Ganyukova AI, Drachko D, Yurchenko V, et al. Development of two species of the *Trypanosoma theileri* complex in tabanids. *Parasites Vectors*. 21 mars 2022;15(1):95.
30. Fetene E, Leta S, Regassa F, Büscher P. Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites Vectors*. 25 janv 2021;14(1):80.
31. Rodrigues CM, Batista JS, Lima JM, Freitas FJ, Barros IO, Garcia HA, et al. Field and experimental symptomless infections support wandering donkeys as healthy carriers of *Trypanosoma vivax* in the Brazilian Semi-arid, a region of outbreaks of high mortality in cattle and sheep. *Parasites Vectors*. déc 2015;8(1):564.
32. Cadioli FA, Barnabé PDA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, et al. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in Sao Paulo state, *Rev Bras Parasitol Vet*. Juin 2012;21(2):118-24.
33. Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-Cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB. Epidemiologic aspects of a fan outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Veterinary Parasitology*. Mai 2010;169(3-4):320-6.
34. De la Cadena E, Camacho M, Vaca F, Enríquez S, Eleizalde MC, Arrivillaga-Henríquez J, et al. Molecular identification of *Trypanosoma theileri* in cattle from the Ecuadorian Amazon. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 1 janv 2023;37:100824.
35. Medina-Naranjo VL, Reyna-Bello A, Tavares-Marques LM, Campos M, Ron-Román JW, Moyano JC, et al. Diagnóstico de los hemotrópicos *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. mediante las técnicas de ELISA y PCR en tres fincas ganaderas de la provincia de Pastaza. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2017;XXVII(3):162-71.
36. Maldonado C, Cáceres A, Burgos A, Hinojosa D, Enriquez S, Celi-Eraza M, et al. Seroprevalencia of trypanosomosis and associated risk factors in cattle from coast and amazonian provinces of Ecuador. *Vet Res Commun*. Juin 2024; 48(3): 1891-8.

37. Zumpt, F. 1973. The Stomoxyine Biting Flies of the World. Diptera: Muscidae. Taxonomy, biology, economic importance and control measures. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. 175 p.

---

**Discussion générale,  
recommandations,  
conclusions et  
perspectives**

---

## Discussion générale

### Les problèmes généraux de l'élevage en Équateur.

En Équateur, les petites unités de production agricole (UPA) représentent 65 % du total national (INEC, 2008). Ce sont des systèmes d'élevage « artisanaux », extensifs sans modernisation, et souvent localisés dans les pires situations géographiques et topographiques (sols pauvres en nutriments, inondés ou très pentus) ; généralement, aucun contrôle sanitaire adéquat des animaux n'est mis en place. Ces UPA, destinées en grande partie à la subsistance des familles du secteur rural, basent l'entretien de leurs troupeaux sur la naissance des animaux ou l'introduction d'animaux achetés aux foires agricoles, sans connaissance de l'état sanitaire de ces animaux ni de leur valeur génétique.

L'économie générée dans les petites UPA repose sur la vente des excédents de lait ou de sous-produits tels que le fromage et, dans les cas extrêmes, sur la vente d'animaux souvent à bas prix, ce qui fait des animaux la "tirelire des familles rurales". La situation décrite ci-dessus est aggravée par le manque d'identification des agents pathogènes causant des maladies chez les animaux d'intérêt pour l'élevage, en raison de la faiblesse ou de l'absence d'investissements de la part de l'État équatorien, de l'absence de mise en œuvre de programmes de surveillance, de traitement, de prévention ou de contrôle des maladies. Il est reconnu qu'un bon programme de lutte contre les maladies repose sur la connaissance, non seulement de la prévalence des maladies, mais également de leur répartition géographique et des outils technologiques existants pour l'identification et le contrôle des agents pathogènes.

Selon la FAO (2011), la présence de maladies infectieuses dans les élevages entraîne quatre conséquences : 1) réduction du cheptel dû à la mort ou à l'abattage des animaux ; 2) diminution de la productivité du bétail ; 3) crises sur les marchés dues à l'instabilité de l'offre et à la demande et 4) perturbations du commerce international des produits de l'élevage (FAO, 2010). En Équateur, les conséquences susmentionnées sont mises en évidence dans le cas de maladies parasitaires telles que la fasciolose bovine, sachant que 9 % des saisies hépatiques à l'abattoir sont dues à la présence de la douve, identifiable grâce à la présence d'abcès et d'épaississement des voies biliaires chez les bovins abattus à l'Abattoir de Quito (Tobar Montesdeoca, 2021), la perte moyenne par foie confisqué s'élève à 24,13 dollars (Núñez-Torres & Chávez-Vargas, 2020). Le bétail équatorien est également touché par des maladies infectieuses telles que la mammite bovine, qui entraîne des pertes de 2,35 dollars par jour en raison de la diminution de la production laitière, comme l'a déterminé une étude longitudinale antérieure réalisée sur 120 vaches en production (Morales Cuichan, 2021).

Un groupe de maladies (anaplasmose, babésiose et trypanosomose) dont les agents pathogènes ont une affinité pour le sang des bovins, à savoir l'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose, a fait

l'objet d'études en Équateur, projets de fin d'études (thèses pour l'obtention d'un diplôme), ainsi que des publications scientifiques, et d'autres travaux.

Parmi ces maladies transmises par les tiques, il y a la babésiose et l'anaplasmose bovines. Bien qu'elles aient déjà été signalées en Équateur, les agents pathogènes responsables de ces maladies n'étaient pas bien caractérisés. En revanche, la trypanosomose bovine, une maladie transmise par les taons et autres mouches hématophages, a été signalée pour la première fois en 1977 par Wells. Toutefois, la situation actuelle de cette maladie en Équateur n'était pas connue, bien que sa présence ait déjà été constatée dans des pays voisins comme la Colombie et le Brésil (De Souza Pimentel et al., 2012; Jaimes-Dueñez et al., 2021).

Dans les zones tropicales et subtropicales, l'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose coexistent chez les bovins, ce qui rend le diagnostic et le traitement difficiles par la combinaison de facteurs, notamment : la complexité clinique, les limites des traitements disponibles et l'interaction entre les agents pathogènes. Une stratégie innovante pourrait consister à étudier ces trois maladies ensemble, afin de mieux contextualiser le problème et de jeter les bases de la formulation de stratégies de diagnostic, de prévention, de traitement et de contrôle. Dans ce contexte, ou dans le but de fournir des connaissances actualisées sur ces trois maladies, des études ont été menées dans les quatre régions naturelles de l'Équateur (Côte, Sierra, Amazonie et région Insulaire).

Tout comme d'autres pays d'Amérique du Sud et du monde, l'Équateur est touché par des activités de déforestation pour l'expansion des terres cultivées et/ou de l'élevage. Ceci contribue au changement climatique à l'échelle mondiale, et qui à son tour a provoqué des changements de comportement chez les humains, chez les animaux sauvages qui peuvent être des hôtes potentiels d'agents pathogènes et chez d'importants vecteurs de transmission de maladies. À ce jour, il est difficile de déterminer l'impact du changement climatique sur les maladies à transmission vectorielle, mais des études récentes ont montré que des températures élevées peuvent forcer les arthropodes tels que les tiques à se déplacer vers de nouvelles zones géographiques (Dantas-Torres, 2015).

La situation géographique de l'Équateur et ses caractéristiques naturelles forment des conditions climatiques, topographiques et végétales diverses dans lesquelles se développent les UPA, ce qui a également permis la création de conditions adéquates pour le développement et l'adaptation de vecteurs potentiellement transmetteurs de maladies, tels que la tique *R. microplus* qui est le vecteur de *Babesia* spp et *A. marginale*, les mouches hématophages telles que *Tabanidés* et *Stomoxys calcitrans* qui sont des vecteurs de *A. marginale* et *Trypanosoma* spp. De plus, ces insectes peuvent coexister dans le même écosystème tout au long de l'année.

Comprendre le problème des maladies hémotropes chez les bovins est complexe en Équateur, en raison de la variété des scénarios et du manque d'études qui couvrent les quatre régions naturelles au pays.

### **L'anaplasmose bovine en Equateur, une maladie qui va rester ?**

Les activités développées et qui soutiennent la présente thèse, ont permis la mise en place d'une série de stratégies de travail dans les UPA, les abattoirs et une attention particulière pour les foyers, dans le but non seulement de déterminer la prévalence des maladies, les facteurs qui y sont associés, mais surtout d'identifier l'agent pathogène responsable.

Le présent travail, dans son ensemble, nous a permis de démontrer qu'*A. marginale* présentait la prévalence la plus élevée, avec des valeurs de 73,5% et 51,9% dans, respectivement, les abattoirs de Quito et Santo Domingo de los Tsáchilas (Étude 4), et même jusqu'à 67,1% chez les bovins échantillonnés dans la province des Galapagos (Étude 5). Les prévalences indiquées ci-dessus, qui font référence à un diagnostic par tests moléculaires, sont similaires à celles rapportées antérieurement dans d'autres régions de l'Équateur, à savoir 63,8 à 65,5% (test ELISA indirect) en Amazonie (Medina-Naranjo et al., 2017 ; Guarnizo et al., 2020) et jusqu'à 90% dans les îles Galapagos (Gioia et al., 2018). La forte prévalence de l'anaplasmose constatée en Équateur est similaire aux prévalences de 71,9% (Ferreira et al., 2022) et 94,8% (Barros et al., 2005) enregistrées au Brésil, pays qui possède les plus grands troupeaux de bovins d'Amérique du Sud.

Parmi les facteurs qui pourraient expliquer la forte prévalence de l'anaplasmose bovine en Équateur, ainsi que dans d'autres pays de la région, figurent les multiples voies de transmission de la bactérie, parmi lesquelles la transmission vectorielle par les tiques. On estime qu'au moins 20 espèces de tiques ont la capacité de transmettre *A. marginale* dans le monde, dont principalement les tiques du genre *Dermacentor* spp et *Rhipicephalus* spp.

Les tiques dites à trois hôtes telles que *Dermacentor andersoni* et *D. variabilis* peuvent transmettre efficacement *A. marginale* par voie intra-stadiale (au sein du même stade larvaire), lorsque les mâles adultes se nourrissent lors de la recherche de femelles, mais aussi par voie trans-stadiale (larves à nymphe, nymphe à adulte ou larve à nymphe puis à adulte) (Aubry & Geale, 2011). *Anaplasma marginale* peut survivre jusqu'à 6 mois au sein des arthropodes (Reyna-Bello, 2014). Son rôle en tant que vecteur de maladie a également été rapporté chez des tiques à hôte unique telle que *Rhipicephalus annulatus*, présente dans les pays d'Amérique centrale, d'Amérique du Sud et en Israël (Kocan et al., 2010). Dans le cas de *Rhipicephalus microplus*, qui est la tique la plus répandue sur le bétail en Amérique

du Sud et donc en Équateur, il a été démontré que bien qu'il s'agisse d'une tique à hôte unique, les mâles et les femelles pourraient jouer un rôle important dans la transmission intra-stadiale d'*A. marginale* grâce à leur comportement migratoire entre hôtes (Mazzucco Panizza et al., 2023). Cependant, certaines études suggèrent qu' *A. marginale* pourrait survivre jusqu'à 72 heures maximum chez cette tique, ce qui limiterait son pouvoir de transmission (Reyna-Bello, 2014).

Dans les pays tels que l'Argentine, le Paraguay et la Martinique, où *R. microplus* n'est pas présent, la forte prévalence de l'anaplasmose bovine peut être liée au rôle important de vecteur des mouches hématophages, ainsi qu'à la voie iatrogène via l'utilisation d'aiguilles contaminées (Reyna-Bello, 2014). Un facteur non moins important à considérer dans l'introduction et la permanence de l'anaplasmose bovine dans les UPA, est la transmission transplacentaire chez l'hôte définitif. Les nouveau-nés infectés de manière persistante peuvent rester apparemment asymptomatiques, ce qui constitue une source importante de contagion et de dissémination de la maladie (Kocan et al., 2010; Pfeffer et al., 2018).

Outre les problèmes sanitaires et épidémiologiques décrits ci-dessus, *A. marginale* présente une grande diversité génétique, avec plus de 100 souches génétiquement distinctes identifiées dans différentes zones géographiques, avec des caractéristiques antigéniques spécifiques et la capacité d'être transmises par les tiques (Battilani et al., 2017). Chez *Anaplasma* spp. six protéines de surface (MSP) ont été identifiées dans les érythrocytes bovins et conservées chez les tiques. Parmi ces protéines, MSP1a, MSP4 et MSP5 possèdent des gènes uniques et ne varient pas antigéniquement au sein des souches; tandis que MSP1b, MSP2 et PSP3 sont multigéniques et peuvent varier antigéniquement, principalement chez les bovins infectés de manière persistante (Aubry & Geale, 2011).

Concernant l'épidémiologie de l'anaplasmose, il est important de considérer qu'*A. marginale* produit des infections persistantes à la fois chez les vecteurs et chez l'hôte, ce qui en fait des porteurs et des transmetteurs potentiels de la bactérie aux populations bovines sensibles (Kocan et al., 2010), ou même des réservoirs (Battilani et al., 2017; Reyna-Bello, 2014). Cela a été confirmé lors de la visite des fermes où la présence d'autres espèces animales d'élevage tels que les petits ruminants, et même la faune sauvage selon la zone d'échantillonnage (Côte, Sierra, Amazonie et région insulaire), a été observée dans les UPA. Des études plus approfondies sont nécessaires pour évaluer la transmission entre différentes espèces animales d'élevage et le bétail (Aubry & Geale, 2011). L'information générée sur la forte présence de l'anaplasmose dans les quatre régions naturelles de l'Équateur suscitent l'inquiétude non seulement à propos des voies de transmission et des vecteurs en présence, mais également sur les éventuels réservoirs animaux dans les UPA.

En raison de la forte prévalence et de la large distribution d'*A. marginale* en Équateur, les études n'ont pas révélé de facteurs de risque pour cette maladie. Cependant, un aspect important à souligner

dans le travail réalisé dans cette thèse est la première caractérisation moléculaire d'*A. marginale* chez les bovins de la région côtière de l'Équateur (Étude 1), ainsi que l'existence de co-infections avec *Babesia* sp et *Trypanosoma* spp. (Études 4 et 5).

Les informations sur la forte prévalence, la large distribution ainsi que la présence de vecteurs nous permettent de supposer que l'anaplasmose serait une maladie qui persisterait pendant longtemps en Equateur Dans la situation indiquée ci-dessus, la stratégie possible serait de coexister (vivre) avec la maladie, au travers de l'immunisation (production d'anticorps) chez les jeunes animaux et la restriction des déplacements d'animaux, notamment entre différentes zones géographiques à statut différent. L'anaplasmose étant une maladie présente dans les quatre régions de l'Équateur, la détermination des capacités vectrices des insectes présents ou de réservoirs tels que d'autres espèces domestiques d'élevage et sauvages dans différentes zones géographiques, pourraient contribuer à une meilleure connaissance de la maladie et son suivi.

### **La babésiose bovine en Équateur, une maladie importante mais négligée**

Concernant la babésiose bovine, la prévalence détectée par PCR dans les recherches qui soutiennent cette thèse était de 18,94% dans la région de la Côte (El Carmen) et de 20,28% dans un foyer à Quito, région de la Sierra (Étude 3). Ces prévalences sont similaires aux 20 % signalés aux Galapagos (Étude 5). La prévalence de *B. bovis* et *B. bigemina* détectée par PCR chez les bovins inspectés dans deux abattoirs (Quito – région de la Sierra, et Santo Domingo de los Tsáchilas – région côtière) n'a pas dépassé 5 % (Étude 4).

En Amérique du Sud, la babésiose est largement répandue, avec des prévalences allant jusqu'à 39,8 % (Ferreira et al., 2022). L'utilisation de tests de diagnostic directs par PCR a montré des prévalences de 31,6% pour *Babesia* spp. dans les zones d'élevage de Colombie (Jaimés-Dueñez et al., 2017) et de 16% et 29%, respectivement pour *B. bigemina* et *B. bovis* au Brésil (Vieira et al., 2017). La forte prévalence et la répartition géographique de la babésiose bovine sont liées à la transmission biologique de ce protozoaire par l'intermédiaire des tiques de la famille des *Ixodidae*. La présence du protozoaire est donc influencée et même conditionnée par la présence du vecteur (Benavides et al., 2016).

Le bétail équatorien n'échappe pas au problème de la présence de tiques, puisque l'infestation par deux espèces de tiques a été démontrée, à savoir *Rhiphicephallus microplus* et *Amblyomma cajennense* s.l., dans les régions de basse altitude (Côte et Amazonie), de chaque côté de la cordillère des Andes (Enríquez et al., 2020; Pérez-Otáñez et al., 2023) et même dans la région insulaire des Galapagos (Gioia et al., 2018). Les bovins étant des hôtes définitifs, des facteurs pouvant favoriser l'établissement de la maladie dans les UPA ont également été décrits tel que l'âge des animaux, en zone

endémique, les animaux ayant développé une immunité après contact avec l'agent causal (et qui peut durer jusqu'à 9 mois) ne présentent pas de manifestations cliniques au stade adulte, établissant la stabilité endémique (Suarez & Noh, 2011).

La stabilité enzootique pourrait être définie comme l'état dans lequel la relation entre l'hôte, l'agent, le vecteur et l'environnement est telle que la maladie ne présente pas de signes cliniques (Suarez & Noh, 2011). Une zone pourrait être classée comme « stable » lorsque 75 % des animaux possèdent des anticorps contre une maladie hémotropique, et une zone pourrait être « instable » lorsque la séroprévalence est comprise entre 12 % et 75 %. Lorsque la séroprévalence est inférieure à 12 %, avec une faible circulation des agents responsables, on parle d'un caractère « sporadique » de la maladie. De fréquents foyers d'agents hémotropes sont signalés dans des zones instables, dans lesquelles la maladie survient principalement chez des animaux adultes provenant de zones à faible prévalence et dépourvues d'anticorps (Bock et al., 2004).

Dans ce contexte, le diagnostic de la maladie devient important, afin de connaître l'état sanitaire des animaux à déplacer entre différentes zones géographiques. Les tests sérologiques de diagnostic indirect sont généralement utilisés en raison de leur sensibilité et de leur spécificité, de leur faible coût apparent et, surtout, de leur disponibilité sur le marché local. Les tests sérologiques tels que l'ELISA sont utilisés pour générer des informations épidémiologiques, et même pour identifier les animaux aux stades subcliniques de l'infection. Malheureusement, ces types de tests sérologiques ne permettent pas de différencier les infections récentes des infections latentes, laissant la place à l'utilisation de tests moléculaires comme la PCR, qui, bien que très sensibles, très spécifiques et très utiles, sont peu utilisés en raison de leur coût élevé.

Un fait important à souligner est la possibilité d'interrompre ou de briser la stabilité endémique de ces maladies, lors des diminutions des populations de tiques dans une zone au sein de laquelle des acaricides efficaces sont utilisés, ou en raison de conditions environnementales défavorables pour ce vecteur (Pfeffer et al., 2018). Chez les bovins, l'absence d'immunité acquise grâce à un contact précoce avec la maladie peut avoir pour conséquence, non seulement le développement de signes aigus sévères de la maladie, voire la mort, chez les bovins concernés, mais aussi qu'ils deviennent des réservoirs de la maladie dans les UPA, autrement dit des « infectés latents », en raison du manque de contrôle de l'infection par le système immunitaire ou par les traitements pharmacologiques (Suarez & Noh, 2011).

Dans le cas d'infections par *B. bovis* et *B. bigemina*, des variations antigéniques peuvent causer des infections latentes chez les bovins apparemment guéris ; ces dernières peuvent durer quelques mois voire plusieurs années. On pense que la diversité antigénique de *Babesia* chez l'hôte vertébré permet aux différentes variantes du parasite de rester plus facilement attachées aux cellules endothéliales, empêchant ainsi leur élimination par la rate, permettant à la maladie de rester dans les UPA et de se

propager à d'autres zones géographiques (Bock et al., 2004). Une étude importante a été réalisée au Brésil, pour la caractérisation des zones « stables et instables » d'anaplasmose et de babésiose bovines. Cette enquête a révélé que la principale cause permettant d'expliquer la présence de la « fièvre à tiques » était les mouvements d'animaux entre des zones à statut épidémiologique différent pour ces deux maladies, ainsi que la présence du vecteur (Puentes & Riet-Correa, 2023).

Dans le cas de l'Équateur, en raison de facteurs de gestion animale inadéquats et de conditions environnementales très changeantes telles que des pluies excessives ou des sécheresses, qui affectent négativement la qualité et la quantité d'herbe produite au sein d'une UPA. Donc, les producteurs sont obligés de déplacer leurs animaux, non seulement entre les provinces d'une même région géographique, mais également entre les régions. Les mouvements des animaux permettent également la mobilisation des tiques, vecteurs importants d'agents hémotropes (Kocan et al., 2010).

En Equateur, le statut de l'anaplasmose et de la babésiose bovines peut se présenter sous la forme d'une stabilité ou d'une instabilité endémique. Des efforts doivent donc viser à maintenir la condition d'endémicité, dont une des stratégies est la standardisation des protocoles de terrain pour la production d'une immunité chez les veaux grâce à un contact précoce avec l'agent causal.

### **La trypanosomose, une nouvelle maladie dans la liste des maladies des bovins**

Il est connu que les bovins d'Amérique du Sud peuvent être exposés à plusieurs espèces de *Trypanosoma* spp., principalement *T. vivax*, *T. evansi*, *T. theileri* et *T. cruzi*. Avant le démarrage de cette thèse, la trypanosomose bovine était peu connue et n'était même pas officiellement rapportée en Equateur : le premier signalement de *T. vivax* par PCR a été réalisé dans le cadre des travaux qui soutiennent cette thèse (Étude 2) et a révélé une prévalence inférieure à 15%. Cette découverte constitue un point de départ important pour le contrôle de la maladie, car connaître l'agent causal spécifique d'une maladie clarifie non seulement le diagnostic mais aussi son épidémiologie et son contrôle.

*T. vivax* est considéré comme le trypanosome le plus pathogène chez les bovins et est connu dans la région sous le nom de « *Cacho hueco* », « *Secadera* » ou « *Cachera* ». Une autre espèce pouvant affecter les bovins est *T. evansi*, particulièrement pathogène pour les camélidés et les chevaux, provoquant le « *Surra* », encore appelé « *Mal de caderas* » ou « *Derrengadera* ». Bien que *T. theileri* soit une espèce moins pathogène pour les bovins, elle est considérée comme un parasite opportuniste et a été identifiée en Équateur (Étude 4). Au contraire, *T. cruzi* est l'agent causal de la maladie de Chagas qui est très prévalente chez l'homme en Amérique latine et qui est modérément ou non pathogène chez les bovins mais qui interfère malheureusement dans le diagnostic de trypanosomose bovine (Desquesnes, 2004).

La présence de *T. vivax* a également été signalée aux Galápagos, où une prévalence de 14,7 % a été mesurée (étude 6), ainsi que dans les abattoirs de Quito et de Santo Domingo de los Tsáchilas, au sein desquels des prévalences de 24,1 % et 10,4 % ont respectivement été estimées (étude 4). Une étude récente réalisée en Equateur a révélé une séroprévalence par test ELISA de 19,1% pour *Trypanosoma* spp. sur un total de 745 échantillons de sérum provenant de 7 provinces côtières et de 3 provinces amazoniennes (Maldonado et al., 2024). *Trypanosoma* spp. n'est pas seulement présent en Équateur, il ne s'agit pas d'une maladie à distribution localisée ou encore moins à faible prévalence. Selon les résultats générés dans cette thèse, la trypanosomose devrait être incluse dans la liste des maladies à surveiller chez les bovins dans les quatre régions naturelles d'Équateur que sont la Côte, la Sierra, l'Amazonie et la région Insulaire.

La présence de *T. vivax* en Équateur était prévisible, car ce protozoaire avait été signalé dans presque tous les pays d'Amérique du Sud, à l'exception du Chili et de l'Uruguay (Desquesnes et al., 2022). La prévalence de la trypanosomose bovine en Amérique du Sud peut varier selon les régions. En Colombie, en utilisant des tests moléculaires comme la PCR, des prévalences globales allant jusqu'à 39,2% ont été mesurées, avec par espèce : 38,6% pour *T. theileri*, 6,7% pour *T. evansi* et 0,2% pour *T. vivax* (Jaimes-Dueñez et al., 2018). Dans des pays comme le Brésil, les prévalences de *T. vivax* varient de 24,6 % à 44,3 %, estimées sur base de, respectivement, une PCR CatL-et une PCR FFLB (Garcia Pérez et al., 2020). En revanche, dans certaines régions argentines telles que *Gran Chaco*, des prévalences de *T. vivax* chez les bovins (n=72) de 29% et 51% ont été rapportées, par PCR CatL et FFLB, respectivement ; dans la Pampa, l'infection chez les vaches laitières (n=54) atteignait respectivement 66,7% et 62,9% pour les deux tests susmentionnés (Florentin et al., 2022).

Sans aucun doute, la connaissance non seulement de l'espèce de l'agent causal, mais aussi de sa distribution géographique et surtout de sa prévalence, est une information importante pour comprendre l'épidémiologie d'une maladie, comme dans le cas de la trypanosomose chez les bovins. Les similitudes et les différences dans les prévalences rapportées dans chaque pays d'Amérique du Sud pour *Trypanosoma* spp. pourraient être dues à la présence de vecteurs tels que les mouches hématophages, à la transmission iatrogène, aux mouvements du bétail, ainsi qu'à la présence de réservoirs naturels.

En ce qui concerne la pathogénicité, en Amérique du Sud, *T. vivax* a été signalée comme l'espèce la plus pathogène chez les bovins, principale raison pour laquelle elle a été considérée comme prioritaire dans la recherche soutenant cette thèse. Les foyers signalés en Amérique du Sud sont causés par *T. vivax*. Les mouvements d'animaux, la présence de mouches piqueuses et l'utilisation d'une même aiguille pour administrer des vaccins ou des médicaments à plusieurs animaux différents sont considérés comme des facteurs de risque (Bastos et al., 2017; Batista et al., 2018; De Souza Pimentel et al., 2012; Florentin et al., 2022; Reis et al., 2019; Vieira et al., 2017). Contrairement au continent africain, l'une des voies de

transmission de ce parasite en Amérique est mécanique, par l'intermédiaire de mouches hématophages telles que les Tabanidae et *Stomoxys* spp. (Osório et al., 2008), arthropodes largement répandus en Amérique du Sud. Les Tabanidae peuvent affecter le bien-être des animaux en provoquant une gêne visuelle et/ou acoustique, à cause de leur bourdonnement notamment, et elles induisent des lésions cutanées douloureuses qui peuvent provoquer des réactions cutanées inflammatoires chez les animaux (Desquesnes, 2004).

Les Tabanidae sont considérées comme un vecteur important de la trypanosomose bovine. On considère qu'une parasitémie comprise entre  $10^5$  à  $10^6$  parasites/mL est suffisante pour rendre l'insecte contaminant. Elles contiennent 1 à 10 uL de sang dans les pièces buccales après s'être nourries. *Trypanosoma* spp. peut survivre pendant environ 30 minutes dans les mouches Tabanidae, mais moins de 9 minutes chez *Stomoxys* spp (Desquesnes, 2004). Dans ces conditions, il est évident que la transmission de ce protozoaire est directement associée à la parasitémie chez les hôtes animaux tels que les bovins, ainsi qu'à la densité de tous les vecteurs possibles (Desquesnes et al., 2009). Au Brésil, lors d'un foyer signalé dans la région de Minas Gerai, une augmentation de la population de mouches *Stomoxys calcitrans* avait été observée dans la zone d'élevage touchée (Cuglovici et al., 2010); toujours au Brésil, dans un autre foyer de *T. vivax* et bien que la présence de mouches Tabanidae n'avait pas été mise en évidence, de grandes populations de mouches *Haematobia irritans* et *Stomoxys calcitrans* avaient été observées (Cadioli et al., 2012). Les preuves scientifiques montrent que l'étude de tous les vecteurs possibles est un point clé dans la connaissance correcte de la maladie, ce qui a également fait l'objet d'une étude dans cette thèse (Étude 6).

Les activités de recherche sur le terrain et en laboratoire ont permis de démontrer la présence de mouches de la famille des Tabanidae dans les trois régions de l'Équateur continental (Côte, Sierra et Amazonie) et l'étroite relation phylogénétique des isolats de *T. vivax* chez les vecteurs et le bétail (Étude 6). De plus, il est important de noter que les recherches effectuées dans le cadre de cette thèse ont démontré la présence d'autres mouches impliquées dans la transmission de *T. vivax* en Équateur comme *Stomoxys calcitrans* (données non publiées).

En Amérique du Sud, la transmission iatrogène causée par l'utilisation d'aiguilles, d'instruments chirurgicaux ou d'ustensiles non stériles utilisés pour le marquage des animaux est un facteur prédisposant à la présence de *T. vivax* chez les bovins, principalement dans les foyers. Au Brésil, l'administration fréquente d'oxytocine pour stimuler la descente du lait pendant la traite a été associée à la présence de foyers de *T. vivax* en raison de l'utilisation d'aiguilles contaminées (Bastos et al., 2017; Vieira et al., 2017). Des cas similaires ont été signalés dans certaines régions d'Argentine (Florentin et al., 2022). L'Équateur n'échappe pas au problème de transmission iatrogène, car la gestion traditionnelle et peu technologique du bétail permet la transmission de la trypanosomose et d'autres maladies par voie iatrogène. En Équateur, la voie iatrogène a déjà été décrite pour d'autres maladies comme la brucellose,

après la découverte chez une chèvre de la souche vaccinale S19 utilisée uniquement chez les bovins et qui pouvait être due à la réutilisation d'une seringue usagée (Ron-Román et al., 2017). Il est non seulement nécessaire de poursuivre les recherches sur la voie iatrogène dans le contexte de l'élevage dans les différentes régions naturelles de l'Équateur, mais aussi et surtout de former les vétérinaires praticiens et les éleveurs à la biosécurité, en mettant l'accent sur des stratégies régulières et pratiques d'intervention.

Dans le cas de *T. vivax*, la trypanosomose peut se présenter sous deux formes : celle de « foyers épidémiques cliniques », et des périodes « inter-épidémiques subcliniques » pendant lesquelles les infections sont éliminées progressivement par auto-guérison ou traitement. Dans ces circonstances, les bovins développent une immunité humorale, par production d'anticorps qui peuvent persister pendant plusieurs années, en maintenant parallèlement une parasitémie très faible. L'apparition des foyers est liée à la présence du protozoaire dans les réservoirs animaux et à la susceptibilité des bovins (immunosuppression saisonnière), à la mobilité (arrivée d'animaux naïfs) ou à une augmentation subite de la densité des vecteurs (Osório et al., 2008). L'alternance entre les deux formes est caractérisée par une longue période au cours de laquelle le parasite n'est pas visible, puis d'explosions cliniques très généralisées (Desquesnes, 2004). Pour les raisons susmentionnées, et comme le montre la présente thèse, une surveillance des vecteurs et de la présence de *T. vivax* chez eux pourrait être une stratégie à prendre en considération (Étude 6). Bien qu'une stratégie de surveillance et de suivi épidémiologique telle que celle utilisée dans cette recherche puisse être limitée par le coût des tests moléculaires, elle pourrait être utilisée dans d'autres zones géographiques telles que les îles Galápagos, où les informations épidémiologiques font défaut.

### **L'identification des facteurs de risque, une base importante pour la formation des techniciens et éleveurs**

Au cours des études réalisées dans la présente thèse, l'échantillonnage des animaux a été entrepris dans les fermes, dans les foyers et dans les abattoirs, le caractère aléatoire étant l'un des paramètres à prendre en compte. Aux Galápagos, l'analyse statistique a montré une différence significative ( $p < 0,05$ ) pour les paramètres suivants : sexe, âge et race des animaux positifs à *Babesia* spp. (Étude 5). Un facteur important à prendre en compte est l'âge car il a été démontré que les bovins âgés de 3 à 9 mois ne développent pas une babésiose clinique, de sorte qu'ils peuvent développer une immunité à long terme contre le parasite (Suarez & Noh, 2011). Il en va de même pour l'anaplasmosse, les jeunes animaux sont plus résistants à l'infection par *A. marginale* que les animaux adultes. Cette caractéristique a été attribuée aux fréquences élevées de circulation des cellules  $T\gamma\delta$  chez les jeunes animaux qui fournissent une protection contre le pathogène (Guerra-Maupome et al., 2019). Dans le cas de *T. vivax*, la gravité des signes cliniques ne dépend pas de l'âge, bien que chez les veaux la progression de la maladie soit rare mais parfois marquée et fatale (Desquesnes, 2004).

Les animaux *Bos taurus* et *Bos indicus* ont été inclus dans les échantillonnages, en respectant une proportionnalité dépendant de la zone d'étude, par exemple, dans la région de la Sierra, *Bos taurus* prédomine. Des études antérieures ont suggéré que, dans le cas d'*A. marginale*, les bovins *Bos taurus* et *Bos indicus* étaient sensibles. Les *Bos indicus* purs présentent une certaine résistance à *Babesia bovis*, l'infection étant plus intense chez les *Bos taurus*, mais cela dépend aussi de la virulence de l'agent pathogène (Bock et al., 1999).

Une constatation non moins importante, et un facteur à prendre en compte, est la variation individuelle au sein de chaque race, qui peut influencer le niveau de parasitémie (Bock et al., 1997). Dans les études réalisées dans le cadre de la présente thèse, il n'a pas été possible de montrer que la race des bovins infectés par *A. marginale* est un facteur de risque en Equateur, probablement en raison de la forte prévalence de la maladie dans les quatre régions naturelles de l'Equateur, et donc parmi les races échantillonnées. Un fait important à comprendre et à retenir dans l'épidémiologie d'*A. marginale* en Équateur est que, si les animaux *Bos taurus* sont plus sensibles, ils pourraient être plus à risque s'ils sont déplacés des zones montagneuses vers les zones côtières ou amazoniennes, régions où la prévalence de la maladie est plus élevée.

En ce qui concerne la babésiose bovine, il a été démontré que les animaux *Bos taurus* sont plus sensibles à *R. microplus* (Guglielmone, 1995); cependant, certaines races appelées « criollas » d'origine ibérique distribuées en Amérique du Sud et en Amérique Centrale sont plus résistantes à *R. microplus*. Les preuves générées dans les études de cette thèse montrent que, bien que la prévalence de *Babesia* spp. en Équateur puisse être faible par rapport à d'autres pathogènes bovins transmis par le sang, une stratégie à prendre en considération pour son contrôle serait l'utilisation de races locales de bovins.

La symptomatologie présentée dans le cas d'infections par *Babesia* spp., est également liée aux races de bovins (*Bos taurus* ou *Bos indicus*), décrivant trois types : animaux « sensibles » avec des signes cliniques graves, animaux « intermédiaires » avec des signes cliniques légers, et animaux « résistants sans signes cliniques » (Chauvin et al., 2009). Le développement des manifestations cliniques chez les animaux infectés peut entraîner une réponse immunitaire retardée, inadéquate ou insuffisante, en raison d'une mauvaise adaptation des espèces de *Babesia* spp. et leurs hôtes vertébrés (Chauvin et al., 2009). L'information scientifique générée dans la présente thèse permet principalement de mettre en évidence l'existence de *B. bovis* et *B. bigemina* sur le territoire équatorien (Études 3, 4 et 5), ainsi que la manifestation de signes liés à l'anémie lors d'un foyer de babésiose bovine chez des animaux *Bos taurus* dans la zone de la Sierra (Étude 3).

D'autre part, des études menées en Amérique du Sud ont démontré l'existence d'une tolérance des races aux infestations par *T. vivax*. Dans un foyer argentin, les auteurs ont constaté que les mâles et les femelles des races Brangus et Braford (*Bos taurus* et *Bos indicus*) étaient plus tolérants à l'infection aiguë par *T. vivax* que les vaches laitières *Bos taurus* (Florentin et al., 2022). L'existence de races dites "trypanotolérantes" est signalée depuis longtemps sur la côte ouest de l'Afrique, une région qui est restée relativement exempte de mouvements génétiques de races de zébus, en raison de la présence de la mouche Tsé-Tsé, principal vecteur de cette maladie (Zhang et al., 2020). Inversement, en Amérique du Sud, les bovins locaux (*Bos taurus* et *Bos indicus*) sont totalement sensibles à la maladie (Desquesnes, 2004). Des preuves récentes générées en Colombie, démontreraient l'existence d'un certain degré de trypanotolérance, en évaluant cliniquement et épidémiologiquement trois races bovines créoles (Jaimes-Dueñez et al., 2021).

Au Brésil, dans le contexte de un foyer, les pertes économiques importantes associées à la trypanosomose bovine ont atteint 39,62 % de la production de lait, différents facteurs de risque ont été identifiés, comme la races de bovin, ainsi que les mouvements d'animaux, et la voie iatrogénique par l'utilisation multiple d'une même seringue/aiguille pour administrer l'ocytocine (De Souza Pimentel et al., 2012). Des informations scientifiques intéressantes ont été générées durant cette thèse, telles que la présence de foyers liée à l'existence de *T. vivax* dans la province de Manabi, où la réutilisation des aiguilles a été confirmée après un traitement ou une vaccination (Étude 2) et la présence de vecteurs tels que les taons et autres mouches hématophages dans les provinces de Manabi, Pichincha et Napo (Étude 6).

Grâce au projet PRD - BruTryp, financé par ARES belge, d'importantes études complémentaires sur la pathogénie des espèces locales de *T. vivax* (infection expérimentale), le bénéfice de l'immunité humorale et cellulaire, ainsi que la production de protocoles de traitement ont été lancées (Chávez-Larrea et al, données non publiées). Un élément important, dans la stratégie de contrôle de la trypanosomose, de la babésiose et de l'anaplasomose bovines en Équateur, a été le renforcement des capacités des techniciens et des éleveurs concernant les cycles évolutifs et les voies de transmission. En outre, un « Guide pratique pour aborder les agents pathogènes véhiculés par le sang des bovins en Équateur » a été rédigé.

### **L'étude intégrée d'*Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp. comme proposition d'une nouvelle approche pour le contrôle des co-infections en Equateur**

Une contribution importante des études réalisées dans le cadre des activités de cette thèse est la mise en évidence de co-infections d'agents hémotropes chez les bovins en Equateur. Bien que le travail

ait été initialement orienté vers l'étude de la trypanosomose bovine dans le pays, le travail de collaboration avec d'autres universités et organismes officiels de contrôle comme AGROCALIDAD a permis d'élargir le sujet de l'étude. Sans aucun doute, un facteur décisif pour l'étude simultanée d'*A. marginale*, *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp. en Équateur a été non seulement la disponibilité d'outils de diagnostic tels que les frottis sanguins, le test de Woo et les techniques moléculaires, mais aussi l'équipe humaine chargée de collecter, de traiter et d'analyser les échantillons.

Comme mentionné ci-dessus, des études ont montré l'existence de co-infections par des agents hémotropes chez les bovins en Équateur. Nous avons constaté que 2,2 % et 6 % des animaux étaient porteurs de trois agents hémotropes dans les abattoirs de Santo Domingo de los Tsáchilas et de Quito, respectivement. Les co-infections associant *A. marginale* et *T. theileri* étaient les plus fréquentes, atteignant respectivement 18,1 % à Quito et 4,4 % à Santo Domingo de los Tsáchilas (Étude 4). De même, les études ont révélé l'existence de coinfections chez les bovins analysés aux Galápagos, où 3,5 % des bovins présentaient les trois agents hémotropes. Les coinfections les plus fréquentes étaient celles associant *A. marginale* et *Babesia* spp. (15,9 %) ainsi qu'*A. marginale* et *T. vivax* (10 %) (Étude 5).

En Amérique latine, des co-infections ont déjà été mises en évidence chez les bovins dans des pays tels que la Colombie, dans les départements d'Antioquia et d'Arauca, où 34,1 % et 16,4 % des bovins étaient infectés simultanément par, respectivement, deux et jusqu'à quatre agents hémotropes (Jaimes-Dueñez et al., 2017). Des co-infections avec quatre espèces d'agents hémotropes ont également été rapportées en Argentine (Paoletta et al., 2018), tandis qu'une étude systématique menée en l'Amérique Latine a identifié des co-infections : *A. marginale* + *Babesia* spp. chez 26,1% des bovins (Ferreira et al., 2022).

Dans ce contexte de coinfections, il est important de rappeler que *Trypanosoma theileri* est considéré comme un parasite cosmopolite (Desquesnes, 2004). En revanche, bien qu'il induit une pathogénicité faible ou nulle lors d'infection simple, il peut toutefois se manifester par une symptomatologie clinique dans les infestations lorsqu'il est associé à d'autres pathogènes (Magri et al., 2021). En Amérique du Sud, *T. theileri*, *T. vivax* et *T. evansi* peuvent présenter des co-infections avec *A. marginale* et *Babesia* spp. En Colombie, par exemple, des infestations mixtes ont été signalées dans 53,9 % des échantillons analysés : 158 (34,1 %) infectés par deux types de pathogènes, 76 (16,4 %) par trois, 14 (3,0 %) par quatre et 2 (0,4 %) par cinq (Jaimes-Dueñez et al., 2017).

Les co-infections signalées dans les études qui soutiennent cette thèse reflètent la présence de *T. vivax* chez les mouches Tabanidae et chez le bétail, ce qui suggère une circulation potentielle du parasite entre ces espèces (Étude 6). L'étude des vecteurs de maladies est donc une question importante, comme le montre la présence d'*A. marginale* dans 27% des tiques de la province côtière de Santo Domingo de los Tsachilas (Maya-Delgado et al., 2020). Les co-infections, en particulier chez les veaux

infectés par *A. marginale* et *T. vivax*, exacerbent la maladie et génèrent la présence de signes cliniques (Bastos et al., 2017) : les animaux sont dans l'impossibilité de contrôler l'infection, à cause de l'immunosuppression causée par *T. vivax* (Ramírez-Iglesias et al., 2017). Aucun signe pathognomonique ne permet de différencier les infections entre *Anaplasma marginale*, *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp., ce qui complique le diagnostic et le traitement des maladies, d'autant plus s'il y a des co-infections. Ce problème est également présent en Équateur, où le manque de tests de laboratoire pour étayer le diagnostic et l'absence de signes spécifiques dans le cas d'infections simples ou de co-infections entraîne de multiples erreurs de diagnostic et de traitement des maladies.

La fièvre était un signe trouvé plus fréquemment chez les animaux atteints de co-infections aux Galápagos (Étude 6), mais dans ce travail, les animaux coinfectés ne présentaient le plus souvent pas de signes cliniques. Ceci a été observé aussi dans les régions du Brésil où les animaux examinés étaient considérés comme cliniquement sains, malgré la présence de co-infections par des agents hémotropes (Garcia Pérez et al., 2020). Même en Argentine, la présence d'une plus grande diversité de parasites a été observée dans des zones où il n'y avait pas de contrôle efficace des tiques (Paoletta et al., 2018).

### **L'épidémiologie moléculaire, un outil pour clarifier le chemin à suivre pour l'étude des agents hémotropes en Équateur**

Parmi les techniques parasitologiques utilisées pour le diagnostic d'*A. marginale*, de *Babesia* spp. et de *Trypanosoma* spp. figure le frottis sanguin avec coloration de Giemsa, technique facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Malgré ses performances, le frottis sanguin n'a pas été utilisé pour mettre en évidence la présence des agents hémotropes dans cette thèse.

Dans le cas du diagnostic d'*A. marginale*, la technique microscopique (frottis sanguin + coloration de Giemsa) est fréquemment utilisée dans les cas où il existe un diagnostic présomptif, associé à la localisation géographique, à la saison, à la présence de vecteurs, ainsi qu'à un faible volume et/ou nombre d'érythrocytes (Aubry & Geale, 2011; Kocan et al., 2010; OMSA, 2023).

Malgré l'apparente simplicité de la technique de frottis sanguin, il est nécessaire de le réaliser sur du sang capillaire périphérique pour augmenter sa fiabilité dans le diagnostic de *Babesia* spp. (Beugnet & Moreau, 2015). Bien que la technique de microscopie permette de détecter un érythrocyte infecté pour 10 000 cellules, un frottis sanguin nécessite d'épandre entre 0,5 et 1 µl de sang. De plus, il peut être difficile et lent d'identifier au microscope les érythrocytes infectés, alors qu'il existe d'autres stades de développement du parasite comme les trophozoïtes dont la forme et la taille peuvent varier (Mosqueda et al., 2012). Pour les raisons susmentionnées, l'utilisation de frottis sanguins devrait être restreint au diagnostic de babésiose chez les bovins présentant des signes cliniques et des antécédents épidémiologiques (Bock et al., 2004).

De même, les tests parasitologiques sur frottis sanguins peuvent également être utilisés pour le diagnostic de la trypanosomose bovine. En revanche, la technique du sang frais a une sensibilité analytique de  $10^4$  à  $10^6$  parasites/mL, tandis que le frottis coloré au Giemsa peut être utilisé pour distinguer les sous-genres et la morphologie du parasite (Desquesnes et al., 2022). Dans le cas de la trypanosomose, la technique parasitologique la plus utilisée est la technique de l'hématocrite ou technique Woo, qui selon l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (*World Organisation for Animal Health* - WOAHA) permet de démontrer la présence du parasite dans une population.

Une des techniques utilisées dans l'étude 3, à savoir la centrifugation de l'hématocrite (HCT, Woo) réalisée pour l'analyse de 218 échantillons bovins, a révélé 13 animaux positifs à *Trypanosoma* spp (6,0%). L'évaluation de l'HCT a constitué un pilier fondamental de cette thèse, non seulement en raison de la sensibilité analytique de  $20 \times 10^2$ - $5 \times 10^3$  parasites/mL (Osório et al., 2008), mais également en raison de son utilité pour identifier le parasite dans l'échantillon analysé, et ensuite permettre sa cryoconservation. Un fait important à retenir est que la sensibilité du test de Woo peut diminuer lorsque l'animal est en phase chronique ou lorsque les niveaux de parasitémie sont faibles. Parmi les avantages de la technique Woo, il y a le fait qu'elle permet l'examen de nombreux animaux en peu de temps, tandis que, comme indiqué ci-dessus, on peut mesurer l'hématocrite (HCT), qui est un paramètre permettant d'aider au diagnostic d'anémie, un signe clinique pertinent dans la trypanosomose bovine (Desquesnes et al., 2022).

Afin d'augmenter la sensibilité analytique et diagnostique d'*A. marginale*, *Babesia* spp. et *Trypanosoma* spp. dans cette thèse, ainsi que la réalisation d'études phylogénétiques contribuant à une meilleure compréhension de l'épidémiologie des maladies, des techniques moléculaires telles que la PCR ont été incorporées. La stratégie décrite ci-dessus a permis la caractérisation d'*Anaplasma marginale*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *T. vivax* et *T. theileri* (Études 1 à 5) chez les bovins des quatre régions de l'Équateur, ainsi que chez les vecteurs (Étude 6).

### **Limites du traitement dans le cadre de la co-infection par des agents hémotropes**

L'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose peuvent présenter des signes cliniques similaires, ce qui complique le diagnostic, en particulier dans les zones endémiques. Un diagnostic incorrect ou tardif peut retarder le traitement approprié, ce qui permet aux agents pathogènes de persister dans les troupeaux. Chacune de ces maladies nécessite un traitement spécifique. Pour l'anaplasmose, on utilise des antibiotiques comme les tétracyclines (Aubry & Geale, 2010) ; pour la babésiose, les médicaments recommandés sont l'imidocarb ou l'acéturate de diminazène (Mosqueda et al., 2012) ; et dans le cas de la trypanosomose, on utilise des médicaments comme le chlorure d'isométymidium ou l'acéturate de diminazène (Magez & Radwanska, 2014).

Lorsque ces trois maladies coexistent, l'administration de traitements spécifiques devient complexe en raison des interactions médicamenteuses possibles, qui peuvent réduire l'efficacité ou augmenter les effets secondaires. En outre, l'utilisation simultanée de plusieurs médicaments peut accroître la toxicité chez les animaux. Les animaux infectés par plusieurs de ces maladies peuvent nécessiter des traitements plus longs, ce qui augmente les coûts de gestion vétérinaire et de médicaments.

L'utilisation répétée de médicaments antiparasitaires dans les zones où ces infections sont présentes peut conduire au développement d'une résistance aux médicaments. La résistance au diminazène et à l'isométramidium a été documentée dans le traitement de la trypanosomose en Afrique (Giorganni et al., 2016). Dans ces cas, les traitements disponibles peuvent devenir moins efficaces.

Dans les zones d'étude de cette thèse, la présence de tiques et de taons, vecteurs capables de transmettre les agents responsables de ces maladies, a été détectée, ce qui pourrait augmenter la probabilité d'infections multiples chez un même animal. Les stratégies de lutte anti-vectorielle ne sont pas toujours efficaces pour stopper la propagation de ces maladies, et le traitement dans ces zones est compliqué par une réinfection constante.

D'autre part, la présence d'infections multiples peut affecter le comportement de chaque pathogène dans l'organisme de l'animal. Les parasites peuvent interagir de manière à aggraver les symptômes, à augmenter la charge parasitaire ou à prolonger la durée de la maladie, (Telfer et al., 2010) Cela signifie qu'une infection peut intensifier la gravité d'une autre, ce qui complique encore le traitement.

Bien que des vaccins soient disponibles pour certaines infections, comme la babésiose, ils ne sont pas toujours accessibles ou pleinement efficaces pour toutes les souches de pathogènes. Dans le cas de la trypanosomose et de l'anaplasmose, les possibilités de prophylaxie sont limitées, ce qui rend la lutte encore plus difficile dans les situations de co-infection. Il est donc nécessaire de mettre en œuvre une gestion intégrée, tant au niveau du diagnostic que du traitement, afin de minimiser les complications et d'améliorer la santé du bétail.

Dans le cadre de cette thèse, un protocole de traitement a été mis en place pour le contrôle de *Trypanosoma vivax* chez les bovins (Annexe 1). L'une des options thérapeutiques pour le traitement de la trypanosomose est le chlorure d'isométramidium, qui n'est pas disponible dans le pays. Actuellement, deux principes actifs sont disponibles : le diacéturate de diminazène et le dipropionate d'imidocarbe, sous diverses présentations commerciales, utilisés traditionnellement pour traiter d'autres maladies telles que l'anaplasmose et la babésiose.

L'objectif de la mise en œuvre du protocole de traitement était d'évaluer l'aspect clinique des animaux infectés expérimentalement par une souche indigène de *Trypanosoma vivax*, ce qui a permis d'obtenir un protocole pour la gestion des animaux dans les foyers, ainsi que d'évaluer deux médicaments commerciaux disponibles en Équateur : le Berenil® Diminazene Diaceturate et l'IMIDOPAR® Imidocarb Dipropionate, et un médicament importé tel que le chlorure d'isométymidium HEMOVEEX®.

La mise en œuvre de ce protocole a permis d'obtenir un protocole de traitement appliqué à la réalité nationale, afin de garantir la guérison rapide des animaux infectés dans les foyers. Il permettra également de prévenir la propagation de la maladie dans les zones endémiques et de minimiser le risque d'apparition de nouveaux foyers. Ce protocole a fait l'objet d'une concertation avec AGROCALIDAD, afin d'établir des stratégies de prévention et de contrôle de la maladie.

## Recommandations

De nouvelles stratégies doivent être mises en œuvre pour guider le travail sur l'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose chez les bovins en Équateur. Voici quelques recommandations :

### **Pour les centres de recherche :**

- Pour étudier les vecteurs potentiels de l'anaplasmose, de la trypanosomose et de la babésiose dans le pays, il est nécessaire de poursuivre l'échantillonnage des arthropodes dans différentes zones climatiques à l'échelle nationale afin d'identifier les espèces de vecteurs, leur abondance et leur distribution, l'interaction hôte-insecte, l'identification des sources d'alimentation en sang, ainsi que les effets du vecteur sur les performances des animaux.
- L'échantillonnage du bétail dans d'autres régions du pays est recommandé pour évaluer l'état clinique des animaux pour ces trois maladies, confirmé par l'analyse de l'hémogramme et de la biochimie sanguine.
- La mise en œuvre de techniques moléculaires pour l'étude du génome, du transcriptome et de la réponse immunitaire aux agents hémotropes est recommandée.
- Développement de protocoles d'obtention de protéines antigéniques pour la standardisation de techniques de diagnostic plus accessibles, moins chères et plus rapides pouvant être utilisées à grande échelle au niveau national et pour le développement de vaccins.

- La recherche sur les races bovines natives existant en Équateur et leur capacité de résistance-tolérance aux agents hémotropes et à leurs vecteurs, ce qui pourrait être d'une grande utilité pour les projets d'amélioration génétique du bétail vis-à-vis de ces maladies.
- Démontrer l'importance de la transmission transplacentaire chez les bovins dans le contexte équatorien.
- Standardisation des protocoles de terrain pour la production d'une immunité chez les veaux après un contact précoce avec l'agent causal.

### **Pour les organismes de contrôle sanitaire**

- Formation des techniciens et des professionnels de santé sur l'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose, leurs facteurs de risque ainsi que sur l'utilisation rationnelle et intégrée des traitements contre les agents hémotropes et leurs vecteurs.
- Les techniciens de terrain doivent avoir accès aux laboratoires de diagnostic, disposer d'un système de communication efficace avec l'autorités sanitaire et avoir la capacité juridique de limiter les mouvements d'animaux.
- Formation continue des techniciens de laboratoire à la manipulation des échantillons et à l'analyse diagnostique pour les trois maladies.
- Créer des alliances stratégiques avec des centres de recherche pour le transfert de technologies et des études conjointes pour la surveillance et le contrôle des maladies.
- Mise en œuvre de techniques de diagnostic accessibles pour le suivi des animaux vivants avant tout déplacement.
- Réalisation d'études pour évaluer les pertes économiques liées à ces maladies et vecteurs telles que la diminution de la production de lait et de viande, la mort des animaux, les traitements et les répercussions sur le commerce des animaux.
- Mise en place d'un système de surveillance durable des trois maladies et de leurs vecteurs au niveau de la ferme, de l'abattoir et des frontières.

### **Pour les éleveurs de bétail**

- Empêcher le mouvement des animaux vers d'autres zones géographiques sans contrôle/traitement adapté.
- Éviter de réutiliser les aiguilles dans les traitements appliqués aux bovins.
- Tenir un registre contenant des informations sur les animaux et les événements sanitaires survenus à la ferme.
- Lorsque la présence d'agents hémotropes est suspectée, demander l'aide d'un professionnel de la santé pour le prélèvement d'échantillons, le diagnostic et le traitement.

## Conclusions

L'application de tests moléculaires a permis non seulement de caractériser pour la première fois les agents hémopathogènes chez les bovins, mais aussi de déterminer leur prévalence dans les régions naturelles de l'Équateur (Côte, Sierra, Amazonie et Galapagos). La prévalence de *T. vivax* variait entre 3,7 et 25,3 % sur le territoire continental et 14,7 % dans la zone insulaire des Galapagos. Pour *T. theileri*, la prévalence était comprise entre 10,4 et 24,1 % sur le territoire continental, sans qu'il soit possible de démontrer la présence du protozoaire aux Galapagos. Dans le cas de *B. bovis*, les prévalences étaient comprises entre 2,2 et 14,7 % et pour *B. bigemina*, entre 1,5 et 4,2 % sur le continent; et dans la région insulaire des Galapagos, elles étaient de 11,2 % pour *B. bovis* et de 14,7 % pour *B. bigemina*. Les prévalences d'*A. marginale* étaient de 51,9 à 86,1 % sur le continent et de 67,1% dans la région insulaire.

Les tests moléculaires constituent un outil important dans la prise en charge des foyers, car ils permettent de confirmer le diagnostic et de déterminer la prévalence. Dans le cas de *T. vivax*, 43,5 % des animaux étaient infestés dans le foyer rapporté dans la région amazonienne. Dans le cas du foyer de babésiose signalé dans la Sierra, 14,69 % des animaux étaient infectés par *B. bovis* et 5,6 % par *B. bigemina*.

Dans la présente étude, la diversité génétique de *T. theileri* a été mise en évidence par la détermination de génotypes et de lignées, montrant en Équateur qu'il existe des génotypes IB et IC appartenant à la lignée ThI et le génotype IIB à la lignée ThII.

Des co-infections ont été mises en évidence ; celles-ci étaient diverses selon les agents pathogènes et la zone géographique étudiée. Des coinfections impliquant *T. vivax*, *T. theileri* et *A. marginale* ont été identifiées chez 18% des bovins analysés dans la Sierra; et des co-infections incluant *T. vivax*, *Babesia* spp. et *A. marginale* ont été mise en évidence chez 3,5% des animaux positifs aux Iles Galapagos. Les éléments factuels suggèrent qu'en Équateur, l'approche face à ces maladies doit être globale afin d'éviter de commettre des erreurs de diagnostic et de traitement.

L'analyse épidémiologique a permis de déterminer des facteurs de risque tels que l'âge des animaux (adultes), le sexe (femelles), les coinfections entre agents pathogènes, la présence d'autres espèces animales (réservoirs) dans les élevages, ainsi que les mouvements d'animaux. Les informations générées représentent un apport important pour la formation non seulement des producteurs, des techniciens de terrain et de laboratoire, des vétérinaires, mais également des autorités officielles telles qu'AGROCALIDAD et l'ABG des Galapagos.

Étant donné la présence de mouches hématophages mise en évidence dans plusieurs zones climatiques ciblées par ce travail, il est probable que la transmission mécanique joue un rôle important dans le maintien de maladies telles que l'anaplasmose et la trypanosomose. La présence de *T. vivax* chez les mouches de la famille Tabanidae et chez le bétail dans la zone d'étude, est une découverte importante pour comprendre le rôle de ces vecteurs dans la transmission des agents hémotropique en Équateur.

## Limites de l'étude

Une fois la thèse terminée et les objectifs atteints, les principales limites suivantes de l'étude réalisée ont été identifiées :

- Concernant la stratégie d'échantillonnage et de collecte d'informations : l'étude aurait pu intégrer une fiche d'échantillonnage contenant des informations zootechniques et épidémiologiques, plus facile à collecter et permettant d'améliorer l'analyse des résultats obtenus à partir des tests de diagnostic. L'étude aurait pu intégrer l'évaluation des signes cliniques actuels ou antérieurs (anamnèse) liés aux maladies étudiées. L'étude aurait également pu augmenter le nombre de foyers des maladies étudiées, clarifiant davantage l'importance des co-infections.
- Une excellente stratégie d'échantillonnage mise en œuvre dans les études a été l'échantillonnage d'animaux dans les abattoirs, mais les informations sur leur origine réelle ou leurs symptômes sont limitées, l'étude aurait également pu échantillonner des animaux dans des abattoirs de la région amazonienne.
- Concernant la réalisation et l'analyse des tests de diagnostic : l'étude aurait pu intégrer d'autres tests de diagnostic sérologique (frottis sanguin, test de Woo, ELISA), afin de déterminer leur sensibilité et leur spécificité, en comparaison avec les tests moléculaires utilisés dans les études de cette thèse.
- Concernant les espèces animales et vecteurs étudiés : L'étude a pu prospecter la recherche d'agents pathogènes chez d'autres espèces animales comme les animaux d'intérêt d'élevage (chevaux) ou les animaux de la faune sauvage (chauves-souris).
- Concernant la zone d'échantillonnage : bien que l'étude ait été réalisée dans une zone géographique importante de l'Équateur, qui couvre les quatre régions naturelles (Côte, montagnes, Amazonie et région insulaire), une recherche des agents causaux dans les zones frontalières avec la Colombie ou le Pérou, là où il y a une mobilité animale, aurait été intéressante..
- La pandémie de COVID-19 a imposé plusieurs limites à cette recherche. Premièrement, les restrictions de mobilité du matériel de laboratoire ont affecté la collecte de données sur le terrain, ce qui a donné lieu à un échantillon plus petit que prévu. De plus, la fermeture temporaire des laboratoires a retardé les expériences programmées et limité la capacité d'acquérir du matériel.

## Perspectives

Après avoir réalisé ces recherches et atteint les objectifs fixés, il reste encore un long chemin à parcourir dans l'étude des maladies causées par des agents hémotropes chez les bovins en Équateur. Des progrès importants ont été réalisés en ce qui concerne la caractérisation des agents pathogènes, la détermination de la prévalence, ainsi que la détermination des facteurs de risque possibles, mais il est nécessaire de mener des recherches à court, moyen et long terme pour établir une base de réflexion et des stratégies solides pour une lutte optimale contre l'anaplasmose, la babésiose et la trypanosomose dans les territoires continentaux et aux Galapagos.

Au cours de la réalisation de cette thèse, ainsi que dans les activités menées dans le cadre du projet PRD BruTryp financé par l'ARES, une plateforme d'appui à la formation et à la sensibilisation, au diagnostic et au développement d'une stratégie de contrôle de la brucellose et de la trypanosomiase a été créée en Equateur. En outre, des informations additionnelles ont été générées (par exemple, une infection expérimentale de bovins par *T. vivax*) mais celles-ci n'ont pas encore été entièrement analysées et devront être portées à l'attention des autorités et de la communauté scientifique internationale.

Il est donc important que les travaux menés jusqu'à présent soient complétés à court terme par la réalisation de nouvelles thèses, qui collectent et analysent des informations sur l'infection expérimentale par une souche locale de *T. vivax*, ainsi que par le développement de protocoles de traitement qui n'existent pas en Équateur à l'heure actuelle.

Une stratégie à analyser pour la formation locale des professionnels sur les "outils biotechnologiques pour le diagnostic, le traitement et le contrôle des maladies chez les animaux" sera considérée comme une opportunité pour créer un master local, qui sera soutenu techniquement et scientifiquement par un personnel formé grâce au projet PRD, ainsi que par la collaboration interuniversitaire avec l'ULiège de Belgique et les organismes de contrôle officiels existant en Équateur (AGROCALIDAD– ABG).

Le développement de produits biotechnologiques permettant non seulement un diagnostic fiable, mais surtout rapide, facile et peu coûteux, est une question prioritaire sur laquelle il faut travailler en Équateur, ainsi que des produits et technologies de nouvelle génération permettant le traitement des bovins infectés par des agents pathogènes hémotropes, augmentant ainsi la sécurité alimentaire. Ces produits biotechnologiques pourraient être utiles à l'Équateur et aux pays voisins qui partagent les mêmes agents pathogènes et problèmes sociaux, économiques et politiques. Il est donc temps d'étendre la collaboration nord-sud et une collaboration sud-sud, avec l'aide des centres de recherche locaux et des universités du Nord.

---

# **Bibliographie**

---

## Références

### [A]

- Abdala, A. A., Larriestra, A. J., & Signorini, M. (2021). Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Revista Veterinaria*, 31(2), 115. <https://doi.org/10.30972/vet.3124728>
- AGROCALIDAD, Pub. L. No. Resolución 0008, DAJ-2020D2-0201 13 (2020). Aprobacion del catalogo de enfermedades de notificacion o declaracion obligatoria.
- Alcindo, J. F., Vieira, M. C. G., Rocha, T. V. P., Cardinot, C. B., Deschk, M., Amaral, G. G., Araujo, R. F. D., Franciscato, C., Castilho Neto, K. J. G. D. A., Machado, R. Z., & André, M. R. (2022). Evaluation of techniques for diagnosis of *Trypanosoma vivax* infections in naturally infected cattle in the Zona da Mata Mineira. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 31(1), e018021. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612022007>
- Atif, F. A. (2015). Anaplasma marginale and Anaplasma phagocytophilum : Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitology Research*, 114(11), 3941-3957. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4698-2>
- Atif, F. A. (2016). Alpha proteobacteria of genus Anaplasma (Rickettsiales : Anaplasmataceae): Epidemiology and characteristics of Anaplasma species related to veterinary and public health importance. *Parasitology*, 143(6), 659-685. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000238>

### [B]

- Aubry, P., & Geale, D. W. (2011). A Review of bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1), 1-30. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01173.x>
- Barros, S. L., Madruga, C. R., Araújo, F. R., Menk, C. F., Almeida, M. A. O. D., Melo, E. P., & Kessler, R. H. (2005). Serological survey of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina*, and *Anaplasma marginale* antibodies in cattle from the semi-arid region of the state of Bahia, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assays. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(6), 513-517. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000600003>
- Bastos, T. S. A., Faria, A. M., Madrid, D. M. D. C., Bessa, L. C. D., Linhares, G. F. C., Fidelis Junior, O. L., Sampaio, P. H., Cruz, B. C., Cruvinel, L. B., Nicaretta, J. E., Machado, R. Z., Costa, A. J. D., & Lopes, W. D. Z. (2017). First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(3), 366-371. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017019>
- Batista, J. S., Moura, G. H. F., & Lopes, F. C. (2018). Factores de riesgo para tripanosomiasis por *Trypanosoma vivax* en bovinos criados en el estado de Rio Grande do Norte.
- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A., & Dondi, F. (2017). Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 195-211. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.021>

- Benavides, E., Romero, J., & Villamil, L. C. (2016). *Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático : Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático* (No. ISBN: 978-92-9248-655-6; Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), p. 96).
- Beugnet, F., & Moreau, Y. (2015). Babesiosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 34(2), 627-639.
- Bock, R., De Vos, A., Kingston, T., & McLELLAN, D. (1997). Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B bigemina* and *Anaplasma marginale*. *Australian Veterinary Journal*, 75(5), 337-340. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1997.tb15706.x>
- Bock, R., Jackson, L., De Vos, A., & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *Parasitology*, 129(S1), S247-S269. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005190>
- Bock, R., Kingston, T., & De Vos, A. (1999). Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Australian Veterinary Journal*, 77(7), 461-464. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1999.tb12093.x>
- Brayton KA, Kappmeyer LS, Herndon DR, Dark MJ, Tibbals DL, Palmer GH, McGuire TC, Knowles DP, Jr.: Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(3):844–849
- Brotánková, A., Fialová, M., Čepička, I., Brzoňová, J., & Svobodová, M. (2022). Trypanosomes of the *Trypanosoma theileri* Group : Phylogeny and New Potential Vectors. *Microorganisms*, 10(2), 294. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020294>

## [C]

- Cadioli, F. A., Barnabé, P. de A., Machado, R. Z., Teixeira, M. C. A., André, M. R., Sampaio, P. H., Junior, O. L. F., Teixeira, M. M. G., & Marqués, L. C. (2012). *Primer informe de brote de Trypanosoma vivax en ganado lechero en Estado de São Paulo, Brasil. 2.*
- Carbonero, A., Guzmán, L. T., Montaña, K., Torralbo, A., Arenas-Montes, A., & Saa, L. R. (2015). *Coxiella burnetii* seroprevalence and associated risk factors in dairy and mixed cattle farms from Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.007>
- Cárdenas, R. E., Buestán, J., & Dangles, O. (2009). Diversity and distribution models of horse flies (Diptera : *Tabanidae*) from Ecuador. *Annales de La Société Entomologique de France (N.S.)*, 45(4), 511-528. <https://doi.org/10.1080/00379271.2009.10697633>
- Castillo Vélez, M. J. (2015). *Análisis de la Productividad y Competitividad de la Ganadería de Carne en el Litoral Ecuatoriano (Resultados de Consultoría para RIMSIP\_Parte 1)* (No. Serie de Documentos de Trabajo N°144; Grupo de Trabajo: Desarrollo con Cohesión Territorial.). Programa: Impactos a Gran Escala. Rimisp.
- Changoluisa, D., Rivera-Olivero, I. A., Echeverría, G., García-Bereguain, M. A., & De Waard, J. H. (2019). Serology for Neosporosis, Q fever and Brucellosis to assess the cause of abortion in two dairy cattle herds in Ecuador. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1924-7>
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). Babesia and its hosts : Adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary*

- Research*, 40(2), 37. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009020Chavez-Lindell>, T. L., Moncayo, A. L., Vinuesa Veloz, M. F., & Odoi, A. (2022). An exploratory assessment of human and animal health concerns of smallholder farmers in rural communities of Chimborazo, Ecuador. *PeerJ*, 9, e12208. <https://doi.org/10.7717/peerj.12208>
- Coello-Peralta, R. D., Solórzano, N. C. C., Peñafiel, K. A. R., Mazamba, M. D. L. S., & Echeverria, E. O. R. (2021). First report of sheep naturally infected with *Trypanosoma* sp. In Ecuador. *Ciência Rural*, 51(1), e20200223. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200223>
- Consejo de Gobierno del Régimen Especial de Galápagos. (2016). *Plan de Desarrollo Sustentable y Ordenamiento Territorial del Régimen Especial de Galápagos* (p. 1273).
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F., & Teixeira, M. M. G. (2009). Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America – characterization, relationships and diagnostic implications. *Molecular and Cellular Probes*, 23(1), 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2008.11.003>
- Costa, R. V. C., Abreu, A. P. M., Thomé, S. M. G., Massard, C. L., Santos, H. A., Ubiali, D. G., & Brito, M. F. (2020). Parasitological and clinical-pathological findings in twelve outbreaks of acute trypanosomiasis in dairy cattle in Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 22, 100466. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100466>
- Cox, A., Tilley, A., McOdimba, F., Fyfe, J., Eisler, M., Hide, G., & Welburn, S. (2005). A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Experimental Parasitology*, 111(1), 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.03.014>
- Cuglovici, Bartholomeu, Reis-Cunha, Carvalho, & Ribeiro. (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>
- Cuglovici, Ultimo de Carvalho, Facury Filho, Mattana Saturmino, & Barbosa Ribeiro. (2009). *Economic impact caused by Trypanosoma vivax in dairy cattle herds in Minas Gerais* (Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria No. 1; Ciencia Animal Brasileira).

## [D]

- Da Silva, A. S., Molosse, V. L., Deolindo, G. L., Cecere, B. G., Vitt, M. G., Nascimento, L. F. N., Bassi Das Neves, G., Sartor, J., Sartori, V. H., Baldissera, M. D., & Miletto, L. C. (2022). *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle : Parasitological and serological diagnosis and its relationship with the percentage of red blood cells. *Microbial Pathogenesis*, 166, 105495. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105495>
- Dagnachew, S., & Bezie, M. (2015). *Review on Trypanosoma vivax*.
- Dantas-Torres, F. (2015). Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases : The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 452-461. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.07.001>
- De La Torre, E., Moreira, N., Saegerman, C., De Clercq, K., Salinas, M., Maldonado, A., Jarrín, D., Sol Vaca, M., Pachacama, S., Espinoza, J., Delgado, H., & Barrera, M. (2021). Bluetongue Virus Infections in Cattle Herds of Manabí Province of Ecuador. *Pathogens*, 10(11), 1445. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111445>

- De Souza Pimentel, D., Do Nascimento Ramos, C. A., Ramos, R. A. D. N., De Araújo, F. R., Borba, M. L., Da Gloria Faustino, M. A., & Alves, L. C. (2012). First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. *Veterinary Parasitology*, *185*(2-4), 286-289. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.019>
- Delgado Bermejo, J. V., Barba Capote, C. J., Aguirre Riofrío, E. L., Cabezas Congo, R., Cevallos Falquez, O. F., Rizzo Zamora, L. G., Vargas Burgos, J. C., Navas González, F. J., Álvarez Franco, L. Á., Biobovis, C., & Martínez Martínez, A. (2020). Molecular inference in the colonization of cattle in Ecuador. *Research in Veterinary Science*, *132*, 357-368. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.07.011>
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. OIE.
- Desquesnes, M., Biteau-Coroller, F., Bouyer, J., Dia, M. L., & Foil, L. (2009). Development of a mathematical model for mechanical transmission of trypanosomes and other pathogens of cattle transmitted by tabanids. *International Journal for Parasitology*, *39*(3), 333-346. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.07.004>
- Desquesnes, M., & Dávila, A. M. R. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes : A review and perspectives. *Veterinary Parasitology*, *109*(3-4), 213-231. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4)
- Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazmand, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., Gimonneau, G., Truc, P., Herder, S., Ravel, S., Sereno, D., Jamonneau, V., Jittapalpong, S., Jacquiet, P., Solano, P., & Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites & Vectors*, *15*(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R., & Jittapalpong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and Surra : A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International*, *2013*, 1-22. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>

## [E]

- Echeverría, G., Reyna-Bello, A., Minda-Aluisa, E., Celi-Erazo, M., Olmedo, L., García, H. A., Garcia-Bereguian, M. A., & De Waard, J. H. (2019). Serological evidence of *Coxiella burnetii* infection in cattle and farm workers : Is Q fever an underreported zoonotic disease in Ecuador? *Infection and Drug Resistance*, *Volume 12*, 701-706. <https://doi.org/10.2147/IDR.S195940>
- Eldin, C., Mélenotte, C., Mediannikov, O., Ghigo, E., Million, M., Edouard, S., Mege, J.-L., Maurin, M., & Raoult, D. (2017). From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection : A Paradigm Change. *Clinical Microbiology Reviews*, *30*(1), 115-190. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-16>
- Eleizalde, M. C., Gómez-Piñeres, E., Ramírez-Iglesias, J. R., & 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>
- Elsworth, B., & Duraisingh, M. T. (2021). A framework for signaling throughout the life cycle of *Babesia* species. *Molecular Microbiology*, *115*(5), 882-890. <https://doi.org/10.1111/mmi.14650>

- Enríquez, S., Guerrero, R., Arrivillaga-Henríquez, J., Araujo, P., Villacrés, E., Enríquez, A., & Benítez-Ortíz, W. (2020). New Records of Ticks of Genus *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari : Ixodidae) for Ecuador. *Acta Parasitologica*, 65(2), 430-440. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00173-7>
- Eshetu, E. (2015). A Review on the Diagnostic and Control Challenges of Major Tick-Borne Haemoparasite Diseases of Cattle. *Journal of Biology*.

## [F]

- FAO. (2010). *La situación de los recursos zoológicos mundiales para la alimentación y la agricultura* (Barbara Rischkowsky y Dafydd Pilling).
- Fernández, D., González-Baradat, B., Eleizalde, M., González-Marcano, E., Perrone, T., & Mendoza, M. (2009). *Trypanosoma evansi* : A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Experimental Parasitology*, 121(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.013>
- Ferreira, G. C. M., Canozzi, M. E. A., Peripolli, V., Moura, G. D. P., Sánchez, J., & Martins, C. E. N. (2022). Prevalence of bovine *Babesia* spp., *Anaplasma marginale*, and their co-infections in Latin America : Systematic review-meta-analysis. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 13(4), 101967. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101967>
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., & Buening, G. M. (1992). Detection of *Babesia bigemina*-infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10), 2576-2582. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.10.2576-2582.1992>
- Figueroa, J. V., Chieves, L. P., Johnson, G. S., & Buening, G. M. (1993). Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, 50(1-2), 69-81. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90008-b](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90008-b)
- Florentin, A. S., Garcia Perez, H. A., Rodrigues, C. M. F. , Dubois, E. F., Monzón, C. M., & Teixeira, M. M. G. (2022). Molecular epidemiological insights into *Trypanosoma vivax* in Argentina : From the endemic Gran Chaco to outbreaks in the Pampas. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(3), 1364-1374. <https://doi.org/10.1111/tbed.14103>

## [G]

- Ganguly, A., Maharana, B. R., & Ganguly, I. (2020). Pentaplex PCR assay for rapid differential detection of *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Anaplasma marginale* and *Trypanosoma evansi* in cattle. *Biologicals*, 63, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.10.011>
- García Pérez, H. A., Rodrigues, C. M. F., Pivat, I. H. V., Fuzato, A. C. R., Camargo, E. P., Minervino, A. H. H., & Teixeira, M. M. G. (2020). High *Trypanosoma vivax* infection rates in water buffalo and cattle in the Brazilian Lower Amazon. *Parasitology International*, 79, 102162. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102162>

- Garros, C., Bouyer, J., Takken, W., & Smallegange, R. C. (Éds.). (2018). *Pests and vector-borne diseases in the livestock industry*. Brill | Wageningen Academic. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-863-6>
- Gioia, G. V., Vinueza, R. L., Marsot, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., Boulouis, H. J., Moutailler, S., Monroy, F., Coello, M. A., Gondard, M., Bournez, L., Haddad, N., & Zanella, G. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(5), 1262-1271. <https://doi.org/10.1111/tbed.12866>
- Giordani, F., Morrison, L. J., Rowan, T. G., De Koning, H. P., & Barrett, M. P. (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: A review. *Parasitology*, 143(14), 1862-1889. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001268>
- Gonzales, J. L., Loza, A., & Chacon, E. (2006). Sensitivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. *Veterinary Parasitology*, 136(2), 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.024>
- Greif, G., Rodriguez, M., Reyna-Bello, A., Robello, C., & Alvarez-Valin, F. (2015). Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 773, 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.008>
- Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R. D. S., Barros, A. T. M. D., Andreotti, R., Cançado, P. H. D., León, A. A. P. D., Pereira, J. B., & Villela, H. S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 150-156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- Guarnizo, T. R. M., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Cabezas-Cruz, A., Gutiérrez, L. Z., Marrero, S. M., & Corona-González, B. (2020). Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(3), 101380. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101380>
- Guerra-Maupome, M., Slate, J. R., & McGill, J. L. (2019). Gamma Delta T Cell Function in Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 35(3), 453-469. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.08.001>
- Guglielmone, A. A. (1995). Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*, 57(1-3), 109-119. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)03115-D](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)03115-D)

## [H]

- Holland, W. G., Claes, F., My, L. N., Thanh, N. G., Tam, P. T., Verloo, D., Büscher, P., Goddeeris, B., & Vercruyse, J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 97(1), 23-33. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00381-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00381-8)
- Homer, M. J., Aguilar-Delfin, I., Telford III, S. R., Krause, P. J., & Persing, D. (2000). Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(3), 451-469.
- Hrazdilová, K., Rybářová, M., Šíroký, P., Votýpka, J., Zintl, A., Burgess, H., Steinbauer, V., Žákovčik, V., & Modrý, D. (2020). Diversity of *Babesia* spp. In cervid ungulates based on the 18S rDNA and cytochrome c oxidase subunit I phylogenies. *Infection, Genetics and Evolution*, 77, 104060. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104060>

## [I]

- INEC. (2008). *Estructura del sector agropecuario, según el enfoque de las características del productor agropecuario y de las unidades de producción agropecuaria* (p. 23).
- INEC. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua* [Reporte electrónico Gobierno República del Ecuador].

## [J]

- Jacob, S. S., Sengupta, P. P., Paramanandham, K., Suresh, K. P., Chamuah, J. K., Rudramurthy, G. R., & Roy, P. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*, 283, 109136. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109136>
- Jaimes-Dueñez, J., Cantillo-Barraza, O., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2020). Molecular surveillance reveals bats from eastern Colombia infected with *Trypanosoma theileri* and *Trypanosoma wauwau*-like parasites. *Preventive Veterinary Medicine*, 184, 105159. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105159>
- Jaimes-Dueñez, J., Mogollón-Waltero, E., Árias-Landazabal, N., Rangel-Pachon, D., Jimenez-Leaño, A., Mejía-Jaramillo, A., & Triana-Chávez, O. (2021). Molecular surveillance of *Trypanosoma* spp. Reveals different clinical and epidemiological characteristics associated with the infection in three creole cattle breeds from Colombia. *Preventive Veterinary Medicine*, 193, 105414. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105414>
- Jaimes-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2017). Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with 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-Dueñez, J., Triana-Chávez, O., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2018). Spatial-temporal and phylogeographic characterization of *Trypanosoma* spp. in cattle (*Bos taurus*) and buffaloes (*Bubalus bubalis*) reveals transmission dynamics of these parasites in Colombia. *Veterinary Parasitology*, 249, 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.004>
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnittger, L. (2019). *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends in Parasitology*, 35(5), 356-368. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.007>

## [K]

- Kessler RL, Contreras VT, Marlière NP, Aparecida Guarneri A, Villamizar Silva LH, Mazzarotto GACA, Batista M, Soccol VT, Krieger MA, Probst CM. (2017). Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Mol Microbiol*. 104(5):712-736. doi: 10.1111/mmi.13653. Epub 2017 May 9. PMID: 28240790.

- Kivaria, F. (2006). Estimated direct economic costs associated with tick-borne diseases on cattle in Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 38(4). <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4181-2>
- Kocan, K. M., Blouin, E. F., & Garcia-Garcia, J. C. (2002). *Adaptations of the tick-borne pathogen, Anaplasma marginale, for survival in cattle and ticks.*
- Kocan, K. M., De La Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*, 167(2-4), 95-107. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.012>

## [M]

- Magez, S., Pinto Torres, J. E., Oh, S., & Radwanska, M. (2021). Salivarian Trypanosomes Have Adopted Intricate Host-Pathogen Interaction Mechanisms That Ensure Survival in Plain Sight of the Adaptive Immune System. *Pathogens*, 10(6), 679. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060679>
- Magez, S., & Radwanska, M. (Éds.). (2014). *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5>
- Magri, A., Galuppi, R., & Fioravanti, M. (2021). Autochthonous *Trypanosoma* spp. In European Mammals : A Brief Journey amongst the Neglected Trypanosomes. *Pathogens*, 10(3), 334. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030334>
- Maldonado, C., Cáceres, A., Burgos, A., Hinojosa, D., Enríquez, S., Celi-Erazo, M., Vaca, F., Ron, L., Rodríguez-Hidalgo, R., Benítez-Ortiz, W., Martínez-Fresneda, M., Eleizalde, M. C., Mendoza, M., Navarro, J. C., & Ramírez-Iglesias, J. R. (2024). Seroprevalence of trypanosomosis and associated risk factors in cattle from coast and amazonian provinces of Ecuador. *Veterinary Research Communications*, 48(3), 1891-1898. <https://doi.org/10.1007/s11259-024-10333-z>
- Maradei, E., Perez Beascochea, C., Malirat, V., Salgado, G., Seki, C., Pedemonte, A., Bonastre, P., D'Aloia, R., La Torre, J. L., Mattion, N., Rodríguez Toledo, J., & Bergmann, I. E. (2011). Characterization of foot-and-mouth disease virus from outbreaks in Ecuador during 2009–2010 and cross-protection studies with the vaccine strain in use in the region. *Vaccine*, 29(46), 8230-8240. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.08.120>
- Martínez, A. M., Gama, L. T., Cañón, J., Ginja, C., Delgado, J. V., Dunner, S., Landi, V., Martín-Burriel, I., Penedo, M. C. T., Rodellar, C., Vega-Pla, J. L., Acosta, A., Álvarez, L. A., Camacho, E., Cortés, O., Marques, J. R., Martínez, R., Martínez, R. D., Melucci, L., ... Zaragoza, P. (2012). Genetic Footprints of Iberian Cattle in America 500 Years after the Arrival of Columbus. *PLoS ONE*, 7(11), e49066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049066>
- Martínez-García, G., Santamaría-Espinosa, R. M., Lira-Amaya, J. J., & Figueroa, J. V. (2021). Challenges in Tick-Borne Pathogen Detection : The Case for *Babesia* spp. Identification in the Tick Vector. *Pathogens*, 10(2), 92. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020092>
- Martins, T. M., Pedro, O. C., Caldeira, R. A., Do Rosário, V. E., Neves, L., & Domingos, A. (2008). Detection of bovine babesiosis in Mozambique by a novel seminested hot-start PCR method. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 225-230. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.037>
- Masake, R. A., Majiwa, P. A. O., Moloo, S. K., Makau, J. M., Njuguna, J. T., Maina, M., Kabata, J., ole-MoiYoi, O. K., & Nantulya, V. M. (1997). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax*

- using the polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*, 85(2), 193-205. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.4124>
- Maya-Delgado, A., Madder, M., Benítez-Ortíz, W., Saegerman, C., Berkvens, D., & Ron-Garrido, L. (2020). Molecular screening of cattle ticks, tick-borne pathogens and amitraz resistance in ticks of Santo Domingo de los Tsáchilas province in Ecuador. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(5), 101492. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101492>
- Mazzucco Panizza, M. N., Rossner, M. V., Signorini, M. L., & Nava, S. (2023). Migration of *Rhipicephalus microplus* ticks among cattle. *Medical and Veterinary Entomology*, 37(2), 418-421. <https://doi.org/10.1111/mve.12625>
- Medina-Naranjo, V., Reyna-Bello, A., Tavares-Marques, L., Campos, A. M., Ron-Román, J., Moyano, J., Jarrín, E., Sandoval, E., & Ma, C.-L. (2017). Diagnosis of hemotropic *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma* spp. And *Babesia* spp. By ELISAI and PCR techniques in three livestock farms of Pastaza Province, Ecuador. *Revista Científica FCV LUZ*, 27.
- Medrado, J. (2018). The Indian zebu in Brazilian lands. *Historia Agraria. Revista de Agricultura e Historia Rural*, 75, 115-138. <https://doi.org/10.26882/histagrar.075e05m>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2013). *Sistema de Clasificación de Ecosistemas del Ecuador Continental* (Subsecretaria de Patrimonio Natural, p. 232).
- Miraballes, C., Aráoz, V., & Riet-Correa, F. (2019). *Rhipicephalus microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay : Current situation and control or elimination programs on farms. *Experimental and Applied Acarology*, 78(4), 579-593. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00405-0>
- Morales Cuichan, M. J. (2021). *Determinación de las pérdidas económicas por mastitis bovina, en un hato de la sierra ecuatoriana, a través del seguimiento longitudinal de la producción, calidad de leche y determinación de células somáticas*. [Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero Agropecuario]. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Mosqueda, Olvera-Ramirez, Aguilar-Tipacamu, & Canto. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19(10), 1504-1518. <https://doi.org/10.2174/092986712799828355>

## [N]

- Núñez-Torres, O. P., & Chávez-Vargas, A. F. (2020). Prevalencia de la hidatidosis en hígados bovinos y pérdidas económicas en el camal municipal de la ciudad de Puyo-Ecuador. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(2).

## [O]

- Odeniran PO, Onifade AA, Omolabi KF, Ademola IO. (2021). Financial losses estimation of African animal trypanosomosis in Nigeria: field reality-based model. *Trop Anim Health Prod*. 11;53(1):159. doi: 10.1007/s11250-021-02603-8. PMID: 33569637.

- OIE. (2018). Tripanosomosis animales (transmitidas por la mosca tse-tse excepto la surra y la durina). In *Manual Terrestre de la OIE* (p. 15).
- Olmeda, A. S., Armstrong, P. M., Rosenthal, B. M., Valladares, B., Del Castillo, A., De Armas, F., Miguelez, M., González, A., Rodríguez Rodríguez, J. A., Spielman, A., & Telford Iii, S. R. (1997). A subtropical case of human babesiosis. *Acta Tropica*, *67*(3), 229-234. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(97\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(97)00045-4)
- OMSA. (2023). *Acceso en línea al Manual Terrestre*. OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal. <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-manual-terrestre/>
- Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R., & Costa, S. C. G. D. (2008). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*: Its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World—A review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *103*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>

## [P]

- Paoletta, M. S., López Arias, L., De La Fournière, S., Guillemi, E. C., Luciani, C., Sarmiento, N. F., Mosqueda, J., Farber, M. D., & Wilkowsky, S. E. (2018). Epidemiology of *Babesia*, *Anaplasma* and *Trypanosoma* species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *9*(2), 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.011>
- Paucar, V., Ron-Román, J., Benítez-Ortiz, W., Celi, M., Berkvens, D., Saegerman, C., & Ron-Garrido, L. (2021). Bayesian estimation of the prevalence and test characteristics (sensitivity and specificity) of two serological tests (RB and SAT-EDTA) for the diagnosis of bovine Brucellosis in small and medium cattle holders in Ecuador. *Microorganisms*, *9*(9), 1815. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091815>
- Paucar-Quishpe, V., Pérez-Otáñez, X., Rodríguez-Hidalgo, R., Cepeda-Bastidas, D., Pérez-Escalante, C., Grijalva-Olmedo, J., Enríquez, S., Arciniegas-Ortega, S., Sandoval-Trávez, L., Benavides-Erazo, B., Vanwambeke, S. O., Saegerman, C., & Ron-Garrido, L. (2023). An economic evaluation of cattle tick acaricide-resistances and the financial losses in subtropical dairy farms of Ecuador : A farm system approach. *PLOS ONE*, *18*(6), e0287104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287104>
- Pérez-Otáñez, X., Rodríguez-Hidalgo, R., Enríquez, S., Celi-Erazo, M., Benítez, W., Saegerman, C., Vaca-Moyano, F., Ron-Garrido, L., & Vanwambeke, S. O. (2023). *High-resolution prediction models for Rhipicephalus microplus and Amblyomma cajennense s.l. Ticks affecting cattle and their spatial distribution in continental Ecuador using bioclimatic factors* [Preprint]. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3234801/v1>
- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015). Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. And *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>
- Pfeffer, M., Król, N., & Obiegala, A. (2018). Prevention and control of tick-borne anaplasmosis, cowdriosis and babesiosis in the cattle industry. In C. Garros, J. Bouyer, W. Takken, & R. C. Smallegange (Éds.), *Pests and vector-borne diseases in the livestock industry* (p. 175-194). Brill | Wageningen Academic. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-863-6\\_7](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-863-6_7)

Puentes, J. D., & Riet-Correa, F. (2023). Epidemiological aspects of cattle tick fever in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 32(1), e014422. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612023007>

## [Q]

Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I., & Rodríguez-Camarillo, S. D. (2016). *Anaplasma marginale* : Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach. *BioMed Research International*, 2016, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2016/9032085>

## [R]

Ramírez-Iglesias, J. R., Eleizalde, M. C., Reyna-Bello, A., & Mendoza, M. (2017). Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela : Evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(2), 450-458. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0826-x>

Ramos, C. J. R., De Souza Franco, C., Da Luz, S. P., Marques, J., De Souza, K. M., Do Nascimento, L. F. N., Das Neves, G. B., Moreira, R. S., & Miletti, L. C. (2023). First record of *Trypanosoma evansi* DNA in *Dichelacera alcornis* and *Dichelacera januarii* (Diptera : *Tabanidae*) flies in South America. *Parasites & Vectors*, 16(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05562-7>

Rar, V., Tkachev, S., & Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria : Twenty years later. *Infection, Genetics and Evolution*, 91, 104833. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104833>

Rashid, M., Rashid, M. I., Akbar, H., Ahmad, L., Hassan, M. A., Ashraf, K., Saeed, K., & Gharbi, M. (2019). A systematic review on modelling approaches for economic losses studies caused by parasites and their associated diseases in cattle. *Parasitology*, 146(2), 129-141. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001282>

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

Reyna-Bello, A. (2014). Anaplasmosis bovina : Logros y retos inmediatos. In *Logros & Desafíos de la Ganadería Doble Propósito* (Vol. 1, p. 703-710). Fundación GIRARZ, Ediciones Astro Data, S.A.

Rodrigues, G. D., Lucas, M., Ortiz, H. G., Dos Santos Gonçalves, L., Blodorn, E., Domingues, W. B., Nunes, L. S., Saravia, A., Parodi, P., Riet-Correa, F., Menchaca, A., Campos, V. F., Krolow, T. K., & Krüger, R. F. (2022). Molecular of *Anaplasma marginale* Theiler (Rickettsiales : Anaplasmataceae) in horseflies (Diptera : *Tabanidae*) in Uruguay. *Scientific Reports*, 12(1), 22460. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-27067-0>

Rodrigues, Garcia, H., Ortiz, Cortez, A. P., Martinkovic, F., Paiva, F., Batista, J. S., Minervino, A. H., Campaner, M., Pral, E. M., Alfieri, S. C., & Teixeira, M. M. G. (2010). Cysteine proteases of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* : Cathepsin L-like gene sequences as targets for

phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. *Parasitology International*, 59(3), 318-325. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.03.002>

Ron-Román, J., Berkvens, D., Barzallo-Rivadeneira, D., Angulo-Cruz, A., González-Andrade, P., Minda-Aluisa, E., Benítez-Ortíz, W., Brandt, J., Rodríguez-Hidalgo, R., & Saegerman, C. (2017). The unexpected discovery of *Brucella abortus* Buck 19 vaccine in goats from Ecuador underlines the importance of biosecurity measures. *Tropical Animal Health and Production*, 49(3), 569-574. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1229-4>

Rosyadi, I., Setsuda, A., Eliakunda, M., Takano, A., Maeda, K., Saito-Ito, A., Suzuki, K., & Sato, H. (2021). Genetic diversity of cervid *Trypanosoma theileri* in Honshu sika deer (*Cervus nippon*) in Japan. *Parasitology*, 148(13), 1636-1647. <https://doi.org/10.1017/S0031182021001360>

## [S]

Saegerman, C., Claes, L., Dewaele, A., Desmecht, D., Rollin, F., Hamoir, J., Gustin, P., Czaplicki, G., Bughin, J., Wullepit, J., Laureyns, J., Roels, S., Berkvens, D., Vanopdenbosch, E., & Thiry, E. (2003). *Differential diagnosis of neurologically expressed disorders in Western European cattle*.

Schnittger, L., Ganzinelli, S., Bhoora, R., Omondi, D., Nijhof, A. M., & Florin-Christensen, M. (2022). The Piroplasmida Babesia, Cytauxzoon, and Theileria in farm and companion animals: Species compilation, molecular phylogeny, and evolutionary insights. *Parasitology Research*, 121(5), 1207-1245. <https://doi.org/10.1007/s00436-022-07424-8>

Shulman, L. M. (Éd.). (2023). *Infectious Diseases*. Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2463-0>

Suarez, C. E., Alzan, H. F., Silva, M. G., Rathinasamy, V., Poole, W. A., & Cooke, B. M. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: Is the sky the limit? *International Journal for Parasitology*, 49(2), 183-197. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.11.002>

Suarez, C. E., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2), 109-125. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.032>

## [T]

Tana-Hernández, L., Navarrete-Arroyo, K., Ron-Román, J., Reyna-Bello, A., & Chávez-Larrea, M. A. (2017). PCR-diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 392. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1311-1>.

Telfer S., Lambin X., Birtles R., Beldomenico P., Burthe S., Paterson S., and Begon M. (2010). Species Interactions in a Parasite Community Drive Infection Risk in a Wildlife Population *Science*. 8; 330(6001): 243–246. doi:10.1126/science.1190333.

Tobar Montesdeoca. (2021). *Causas de decomiso en la inspeccion SANITARIA DE BOVINOS, FAENADOS EN EL CAMAL DE LA EMPRESA PÚBLICA METROPOLITANA DE RASTRO QUITO*. Universidad Técnica de Cotopaxi.

## [U]

Ungogo MA, de Koning HP (2024). Drug resistance in animal trypanosomiasis: Epidemiology, mechanisms and control strategies. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 25:100533. doi: 10.1016/j.ijpddr.2024.100533. Epub 2024 Mar 30. PMID: 38555795; PMCID: PMC10990905.

## [V]

Vargas, J., Landi, V., Martínez, A., Gómez, M., Camacho, M. E., Álvarez, L. Á., Aguirre, L., & Delgado, J. V. (2016). Molecular Study of the Amazonian Macabea Cattle History. *PLOS ONE*, 11(10), e0165398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165398>

Verdezoto, J., Breard, E., Viarouge, C., Quenault, H., Lucas, P., Sailleau, C., Zientara, S., Augot, D., & Zapata, S. (2018). Novel serotype of bluetongue virus in South America and first report of epizootic haemorrhagic disease virus in Ecuador. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(1), 244-247. <https://doi.org/10.1111/tbed.12625>

Vieira, O. L. E., Macedo, L. O. D., Santos, M. A. B., Silva, J. A. B. A., Mendonça, C. L. D., Faustino, M. A. D. G., Ramos, C. A. D. N., Alves, L. C., Ramos, R. A. N., & Carvalho, G. A. D. (2017). Detection and molecular characterization of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 26(4), 516-520. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017048>

Villalobos-Cortés, A., Martínez, A., Vega-Pla, J. L., Landi, V., Quiroz, J., Marques, J. R., & Delgado, J. V. (2015). Genetic relationships among five zebu breeds naturalized in America accessed with molecular markers. *Italian Journal of Animal Science*, 14(2), 3280. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3280>

Vinueza, R. L., Durand, B., & Zanella, G. (2022). Network analysis of cattle movements in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, 201, 105608. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105608>

## [W]

Wang, J., Liu, A., Zhang, S., Gao, S., Rashid, M., Li, Y., Liu, J., Ma, Q., Li, Z., Liu, Z., Luo, J., Guan, G., & Yin, H. (2019). High resolution melting analysis of the 18S rRNA gene for the rapid diagnosis of bovine babesiosis. *Parasites & Vectors*, 12(1), 523. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3781-4>

Witola, W. H., Sarataphan, N., Inoue, N., Ohashi, K., & Onuma, M. (2005). Genetic variability in ESAG6 genes among *Trypanosoma evansi* isolates and in comparison to other Trypanozoon members. *Acta Tropica*, 93(1), 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.09.006>

Wells EA, Betancourt A, Ramirez LE. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the new world. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 71:448–9

## [Z]

Zhang, K., Lenstra, J. A., Zhang, S., Liu, W., & Liu, J. (2020). Evolution and domestication of the Bovini species. *Animal Genetics*, 51(5), 637-657. <https://doi.org/10.1111/age.12974>



---

# **Annexes**

---

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS-ESPE**  
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**  
**PROYECTO BRUTRYP**

**“Protocolo de tratamiento para *Trypanosoma vivax* en el ganado bovino en Ecuador”**

**INFORMACIÓN GENERAL DEL PROTOCOLO:**

**Código del protocolo:** Typ\_Tratamiento\_v1

**Versión del protocolo:** V=1

**Fecha de actualización:** 20 de marzo del 2023

**1. PERSONAL PARTICIPANTE**

Dra. María Augusta Chávez PhD(c) Docente investigadora del Departamento de Ciencias de la Vida Matriz, ESPE, Grupo de investigación GISAH.

Dr. Armando Reyna PhD Docente investigador del Departamento de Ciencias de la Vida Santo Domingo, ESPE, Grupo de investigación GISAH.

Dr. Jorge Ron PhD Docente investigador del Departamento de Ciencias de la Vida Matriz, ESPE, Grupo de investigación GISAH

Ing. Cristina Cholota, Laboratorista del Laboratorio de Biotecnología Animal, Carrera de Biotecnología, Grupo de investigación GISAH

Ing. Gabriela Morales, Laboratorista del Laboratorio de Reproducción y Sanidad Animal, IASA I, ESPE.

Srta. Nikole Morales, Tesista, Carrera IASA I, ESPE.

Srta. Michelle Cisneros, Tesista Carrera IASA I, ESPE.

Srta. Alison Changoluisa, Tesista Carrera de Biotecnología, ESPE.

Srta. Joselyn Espinoza, Tesista Carrera de Biotecnología, ESPE.

## 2. CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran no tener conflictos de interés en la elaboración/revisión de este protocolo.

## 3. INTRODUCCION

La trypanosomosis animal es una enfermedad ocasionada por un protozooario flagelado que parasita la sangre, linfa y algunos tejidos del huésped (1). Hay tres especies de tripanosomas que afectan al ganado bovino: *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma theileri*, de estos, *T. vivax* es el más patógeno. La transmisión puede ser mecánica a través de moscas hematófagas como *Tabanus*, *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia* u otros animales que se alimentan de la sangre como murciélagos (2) (3), y por la vía iatrogénica (1).

Los bovinos afectados por *T. vivax* pueden ser asintomáticos durante el periodo prepatente que puede durar de 2 a 10 días (4), pero dependerá de la patogenicidad del parásito, susceptibilidad, respuesta inmunitaria y condición física del hospedador (5). Durante el periodo agudo aparecen los parásitos en la sangre y puede durar de 1 a 2 meses, este periodo se caracteriza por un incremento de temperatura que coinciden con la parasitemia que se detecta cada 8-15 días, los animales presentan una destrucción de eritrocitos dando lugar a una anemia leve a grave, otros síntomas evidenciados en este periodo agudo son lagrimeo, edema submandibular, descargas nasales, pérdida progresiva de peso y letargo; además se pueden presentar alteraciones en el sistema reproductor tanto del macho (inhibición total de la espermatogénesis, con degeneración testicular y epididimaria) como en hembras (anestro transitorio o permanente, ciclos estrales anormales y abortos) (4).

## 4. JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador, la crianza del ganado bovino es la más importante actividad pecuaria del país, para el 2010 se estimó que existen 4.066.930 de cabezas de ganado bovino, en donde el

41.24% (1.591.390) está en la región del litoral y el 9.65% (364.567) en la amazonia (6), podrían estar expuestos a la trypanosomosis.

Además, en el Ecuador, la trypanosomosis es una enfermedad poco conocida, y se confunde con otros microorganismos como *Anaplasma marginale* y *Babesia* spp. ya que los bovinos afectados por estas enfermedades tienen signos en común como anemia, fiebre, pérdida de peso y debilitamiento, se ha evidenciado también coinfecciones entre estos hemotrópicos (7), y esto ha dificultado el diagnóstico y la elección del tratamiento adecuado.

Aunque *T. vivax* normalmente permanece en el sistema vascular del huésped, algunas cepas pueden, ubicarse en tejidos como ganglios linfáticos, ojos y líquido cefalorraquídeo donde es menos accesible el tratamiento farmacológico y al ser una especie difícil de cultivar in vitro, los estudios sobre la efectividad de los tratamientos ha sido limitado en relación a otros tripanosomas (8).

En América Latina, los fármacos de elección para el tratamiento de la trypanosomosis bovina ocasionada por *T. vivax* son el aceturato de diminazeno y el cloruro de isometamidio (4). En el Ecuador, el medicamento disponible es el aceturato de diminazeno, que se utiliza comúnmente para el tratamiento de Babesiosis. Estudios han evidenciado resistencia a estos fármacos por parte de algunos aislados de *T. vivax*, debido a su uso indiscriminado y los largos periodos de tratamiento, sin embargo sus efectos secundarios tóxicos son relativamente bajos (4). El cloruro de isometamidium es un fármaco que no se comercializa en el país, y se considera el tratamiento de elección en áreas enzoóticas con alta prevalencia de *T. vivax*. La aplicación de un tratamiento efectivo y preciso es fundamental para el control de *T. vivax*, ya que los animales que no son tratados pueden convertirse en portadores clínicos asintomáticos, pudiendo propagar y mantener la enfermedad en el resto del hato (9).

## **5. OBJETIVO**

El objetivo del presente protocolo es proveer de un tratamiento efectivo y accesible para el control de *T. vivax* en el ganado bovino en el Ecuador.

## **6. USUARIOS**

El presente protocolo proporciona información sobre el tratamiento terapéutico para casos de *T. vivax*, está dirigida a médicos veterinarios, técnicos agropecuarios, zootecnistas tanto del sector privado como público, que están involucrados en la detección y tratamiento de enfermedades en el ganado bovino en fincas de producción de leche y carne.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1. Infección experimental para la implementación de un protocolo de tratamiento contra *T. vivax*

### 7.2. Comité de bioética

Para la implementación del presente protocolo, se procedió a realizar una infección experimental en bovinos mediante una cepa nativa de *T. vivax*, antes de iniciar el estudio se obtuvo un dictamen favorable por parte del comité de Bioética de la Universidad San Francisco de Quito según oficio: 2021-009 con fecha 19 de enero del 2022.

### 7.3. Animales de experimentación

Un total de 12 bovinos machos, *Bos taurus* de 3 a 4 meses de edad fueron divididos en 4 grupos, el grupo T0 de 3 bovinos como control y tres grupos (T1, T2 y T3) que fueron infectados con una cepa nativa de *T. vivax* a una dosis de  $1 \times 10^6$  Trypanosomas/mL por vía intravenosa, los animales de los 3 grupos fueron tratados a los 8 días pos infección con 3 diferentes fármacos comerciales:

1. **Grupo T1** formado por 3 bovinos que fueron tratados con el medicamento comercial Berenil® Diaceturato de Diminazeno + Antipirina (Adquirido localmente, marca Intervet S.A.). Cada bovino recibió 7 mg/kg de peso, vía IM y se repitió la dosis a los 10 días.
2. **Grupo T2** formado por 3 bovinos tratados con IMIDOPAR® Dipropionato de Imidocarb (Adquirido localmente, marca KYROVET S.A.). Cada bovino recibió una dosis única de 4,8 mg / kg de peso, vía IM.
3. **Grupo T3** formado por 3 bovinos tratados con HEMOVEEX® Cloruro de Isometamidium + Ivermectina (producto importado país de origen Venezuela, marca

REVEEEX C.A.), los animales recibieron una dosis única de 1 mg / kg de peso, vía IM.

#### **7.4. Análisis de muestras de sangre**

De cada animal se obtuvo una muestra de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA), al día -1 (día antes de la infección), al día 0 (día de la infección), y a los días 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25, 29, 32, 35, 40, 42.

Las muestras de sangre obtenidas de cada bovino fueron analizadas mediante la prueba molecular TviCatL-PCR (10) y por la técnica de la centrifugación del hematocrito (denominada también técnica de Woo o HCT), para evidenciar la presencia del parásito.

La técnica HCT consiste en colocar 70 µl de sangre con EDTA en un tubo capilar heparinizado (75 × 1,5 mm), se cierra uno de los extremos con plastilina y se centrifugan a 10.000 g durante 5 minutos (en general, 12.000 rpm en una centrífuga de hematocrito). A continuación, el tubo capilar se observa al microscopio (100x), los tripanosomas son las células móviles que se concentran en la unión entre la capa leucocitaria y el plasma (11)

#### **7.5. Resultados**

##### **Análisis de la parasitemia mediante los métodos de diagnóstico: Woo y TviCatL-PCR en los bovinos T1 Diminazeno (Berenil®).**

Los tres animales del grupo T1 (Bovino #4, #7 y #9), mostraron fluctuaciones parasitarias los días 4 y 7, posteriormente fueron tratados en el día 8 con la 1ra dosis del medicamento. Al analizar las muestras en el día 11 (tercer día pos-tratamiento) no se observó al parásito por ninguno de los métodos descritos. La segunda dosis del medicamento se administró en el día 18 (10 días luego de la primera dosis). En los bovinos #4 y #7 no se observó la presencia del parásito hasta el final del experimento (42 días), sin embargo, en el día 21 se observó la presencia del parásito en la sangre del bovino #9 mediante el método de Woo y el animal falleció en el día 25.

##### **Análisis de la parasitemia mediante los métodos de diagnóstico: Woo y TviCatL-PCR en los bovinos T2 Imidocarb (Imidopar®).**

Los bovinos del grupo T2 (#2, #12 y #13), mostraron fluctuaciones parasitarias los días 4 y 7, posteriormente fueron tratados al día 8 (pos-infección). En el día 11 (tercer día pos-tratamiento) no se observó la presencia del parásito en la sangre del bovino #2, mediante las

técnicas utilizadas, no obstante, a partir del día 21 (día 13 pos-tratamiento) el bovino fue positivo mediante las técnicas de Woo y PCR hasta el día 35 en donde se trató al bovino con Cloruro de Isometamidium, determinando la ausencia del parásito en posteriores análisis. El bovino #12 murió al séptimo día pos-infección y el bovino #13 murió en al octavo el día pos-infección por lo que no se pudo realizar el seguimiento.

### **Análisis de la parasitemia mediante los métodos de diagnóstico: Woo y TviCatL-PCR en los bovinos T3 Isometamidium (Hemoveex®).**

Los bovinos T3 (#3, #5 y #8), mostraron fluctuaciones parasitarias los días 4 y 7, posteriormente fueron tratados al día 8 (post-infección). En el día 11 (tercer día post-tratamiento) no se observó al parásito mediante ninguna técnica descrita manteniéndose así hasta el final del experimento.

#### **7.6. Conclusiones**

- El tratamiento a base de cloruro de isometamidium en una dosis única de 1 mg/kg es el tratamiento más efectivo para el control de *T. vivax*.
- El diaceturato de diminazeno en dos dosis de 7 mg/kg con un intervalo de 10 días, es también efectivo para el control de *T. vivax*. No obstante, un animal mostró baja parasitemia después de las dos dosis, por lo que este medicamento es eficiente para eliminar las parasitemia y los síntomas pero no logra eliminar completamente al parásito.

## **8. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO RECOMENDADO**

### **Tratamiento 1**

**Nombre del fármaco:** clorhidrato de cloruro de isometamidio

**Nombre comercial:** HEMOVEEX®



**Composición:** Las formulaciones veterinarias tienen una mezcla de cuatro compuestos de fenantridina: clorhidrato de cloruro de isometamidio [clorhidrato de cloruro de 8-(3-mamidinofenil-2-triazeno)-3-amino-5-etil-6 fenilfenantridinio], el isómero rojo posicional [3-(clorhidrato de cloruro de 3-m-amidinofenil-2-triazeno)-8-amino-5-etil-6-fenilfenantridinio], el isómero azul [clorhidrato de 7-(mamidinofenildiazo)-3,8-diamino-5-etil-6 fenilfenantridinio ], y el compuesto disustituido [diclorhidrato de cloruro de 3,8-di(3-m-amidinofeniltriazeno)-5-etil-6-fenilfenantridinio].

**Mecanismos de acción:** Su alta afinidad por el DNA del kinetoplasto podría ser la base de su actividad tripanocida (8).

**Acción:** Terapéutica y profiláctica

**Dosis terapéutica:** 0.5 mg/kg

**Dosis profiláctica:** 1 mg/kg. Este medicamento tiene acción profiláctica por 5 meses

**Especie animal:** Bovinos *Bos taurus* y *Bos indicus* de todas las edades

**Vía de administración:** Intra muscular

**Efecto adverso:** Múltiples administraciones intramusculares de isometamidium pueden causar lesiones fibrosas severas, dañando así la canal y la calidad de la carne del ganado. Evitar la administración subcutánea. Altamente irritante. Posibles reacciones locales en bovinos. La duración de la actividad profiláctica luego de la administración intramuscular en bovinos es típicamente de 2 a 3 meses y puede ser de hasta 6 meses (8).

**Tiempo de retiro:** 30 días para el consumo de productos derivados de bovinos tratados con el fármaco.

## **Tratamiento 2**

**Nombre del fármaco:** Aceturato de diminazeno  
(4,4'(azoamino) dibenzamidina)

**Nombre comercial:** Berenil®



**Composición:** El acetaruto de diminazeno es una diamidina aromática, derivada de Surfén (bis-2-metil-4-aminoquinolil-6 carbamida). Se comercializa en combinación con el estabilizante antipirina (1'2-dihidro-1'5-dimetil-2-fenil-3h-pirazona-3-ona), en una concentración de 55%, que se agrega debido a la breve estabilidad del diminazeno en agua (12).

**Mecanismos de acción:** El diminazeno se une irreversiblemente al ADN de doble cadena del cinetoplasto (ADNk), lo que altera la replicación y la función del cinetoplasto (12).

**Acción:** Terapéutica no se usa para la profilaxis, ya que se metaboliza y excreta rápidamente (8).

**Dosis terapéutica:** 7 mg/kg y a los 10 días repetir la dosis

**Especie y edad del animal:** Bovinos *Bos taurus* y *Bos indicus* de todas las edades

**Vía de administración:** Intra muscular

**Efecto adverso:** Tóxico para caballos, burros, perros y camellos.

**Tiempo de retiro:** 21 a 35 días en bovinos de carne y 3 días en bovinos de leche

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Desquesnes M. Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. Paris: OIE; 2004. 174 p.

2. Magez S, Pinto Torres JE, Oh S, Radwanska M. Salivarian Trypanosomes Have Adopted Intricate Host-Pathogen Interaction Mechanisms That Ensure Survival in Plain Sight of the Adaptive Immune System. *Pathogens*. 31 mai 2021;10(6):679.
3. Pays E, Radwanska M, Magez S. The Pathogenesis of African Trypanosomiasis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 24 janv 2023;18(1):19-45.
4. Magez S, Radwanska M, éditeurs. *Trypanosomes and Trypanosomiasis* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 2014 [cité 30 mars 2023]. Disponible sur: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-1556-5>
5. Desquesnes M, Gonzatti M, Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, et al. A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites Vectors*. déc 2022;15(1):64.
6. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos Ecuador INEC. Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). Quito-Ecuador: INEC; 2019 p. 33.
7. Jaimes-Dueñez J, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Ticks and Tick-borne Diseases*. févr 2017;8(2):290-9.
8. Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, De Koning HP, Barrett MP. The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*. déc 2016;143(14):1862-89.
9. Betancur Hurtado OJ, Jimenez Castro PD, Giraldo-Ríos C. Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Veterinary Parasitology*. oct 2016;229:54-9.
10. Chávez-Larrea MA, Medina-Pozo ML, Cholota-Iza CE, Jumbo-Moreira JR, Saegerman C, Proaño-Pérez F, et al. First report and molecular identification of *Trypanosoma*

- (Duttonella) vivax* outbreak in cattle population from Ecuador. *Transbound Emerg Dis.* juill 2021;68(4):2422-8.
11. OIE. Tripanosomosis animales (transmitidas por la mosca tse-tse, excepto la surra y la durina. In: *Manual Terrestre la OIE 2018.* 2018. p. 15.
  12. J. Mosqueda, A. Olvera-Ramirez, G. Aguilar-Tipacamu, G. J. Canto. Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *CMC.* 4 avr 2012;19(10):1504-18.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2024/0480/17

ISBN 978-2-87543-222-3

