

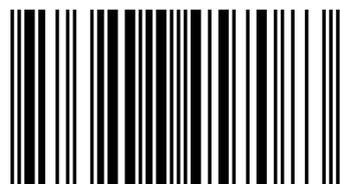
Detección de infecciones por *Trypanosoma vivax*

Las características biológicas que presentan los aislados americanos de *T. vivax* dificultan el desarrollo de métodos diagnósticos especie-específicos, que conlleva a la utilización de antígenos de otros patógenos como *T. evansi*. Por tal razón, se plantea el desarrollo de una metodología basada en la caracterización proteica y antigénica de *T. vivax* y el empleo de la PCR para un diagnóstico confiable en las infecciones producidas por este *Trypanosoma*. Para el desarrollo bioquímico, se utilizó el método de separación Tritón X-114 empleando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, discriminando entre las diferentes fracciones proteicas del parásito de acuerdo a su peso molecular, confrontándolas con las proteínas detectadas en *T. evansi* separadas por igual metodología. Las proteínas inmunogénicas detectadas al utilizar sueros de animales positivos a *T. vivax* y *T. evansi* evidenció la ausencia de reactividad cruzada entre ellos, pudiendo ser utilizadas como marcadores específicos para su identificación y caracterización, permitiendo, asimismo, un diagnóstico diferencial en el ganado bovino.



Ana Maria Bolivar

Analista y parasitóloga (Universidad de los Andes-Ven), con línea de investigación en ecoepidemiología de hemoparasitosis bovinas y tripanosomiasis americanas. Acreedora de distinciones, con publicaciones en congresos y revistas indexadas. Al presente ejerce como docente en la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (ULA).



978-3-8484-5708-3

editorial académica española



Ana Maria Bolivar

Detección de infecciones por *Trypanosoma vivax*

Mediante las herramientas diagnósticas Western blot y PCR se diferencian infecciones por *T. vivax* en ganado bovino

Ana Maria Bolivar

Detección de infecciones por Trypanosoma vivax

Ana Maria Bolivar

**Detección de infecciones por
Trypanosoma vivax**

**Mediante las herramientas diagnósticas Western
blot y PCR se diferencian infecciones por T. vivax
en ganado bovino**

Editorial Académica Española

Impresión

Información bibliográfica publicada por Deutsche Nationalbibliothek: La Deutsche Nationalbibliothek enumera esa publicación en Deutsche Nationalbibliografie; datos bibliográficos detallados están disponibles en internet en <http://dnb.d-nb.de>.

Los demás nombres de marcas y nombres de productos mencionados en este libro están sujetos a la marca registrada o la protección de patentes y son marcas comerciales o marcas comerciales registradas de sus respectivos propietarios. El uso de nombres de marcas, nombre de producto, nombres comunes, nombre comerciales, descripciones de productos, etc. incluso sin una marca particular en estas publicaciones, de ninguna manera debe interpretarse en el sentido de que estos nombres pueden ser considerados ilimitados en materias de marcas y legislación de protección de marcas y, por lo tanto, ser utilizadas por cualquier persona.

Imagen de portada: www.ingimage.com

Editor: Editorial Académica Española es una marca de
LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Alemania
Teléfono +49 681 3720-310, Fax +49 681 3720-3109
Correo Electronico: info@eae-publishing.com

Publicado en Alemania

Schaltungsdienst Lange o.H.G., Berlin, Books on Demand GmbH, Norderstedt,
Reha GmbH, Saarbrücken, Amazon Distribution GmbH, Leipzig
ISBN: 978-3-8484-5708-3

Imprint (only for USA, GB)

Bibliographic information published by the Deutsche Nationalbibliothek: The Deutsche Nationalbibliothek lists this publication in the Deutsche Nationalbibliografie; detailed bibliographic data are available in the Internet at <http://dnb.d-nb.de>.

Any brand names and product names mentioned in this book are subject to trademark, brand or patent protection and are trademarks or registered trademarks of their respective holders. The use of brand names, product names, common names, trade names, product descriptions etc. even without a particular marking in this works is in no way to be construed to mean that such names may be regarded as unrestricted in respect of trademark and brand protection legislation and could thus be used by anyone.

Cover image: www.ingimage.com

Publisher: Editorial Académica Española is an imprint of the publishing house
LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG
Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Germany
Phone +49 681 3720-310, Fax +49 681 3720-3109
Email: info@eae-publishing.com

Printed in the U.S.A.

Printed in the U.K. by (see last page)

ISBN: 978-3-8484-5708-3

Copyright © 2012 by the author and LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG
and licensors

All rights reserved. Saarbrücken 2012

DETECCION DE INFECCIONES POR *Trypanosoma vivax*
MEDIANTE LAS HERRAMIENTAS DIAGNOSTICAS WESTERN BLOT Y PCR SE
DIFERENCIAN INFECCIONES POR *T. vivax* EN GANADO BOVINO

ANA MARIA BOLIVAR

RESUMEN

Las características biológicas que presentan los aislados americanos de *T. vivax* dificultan el desarrollo de métodos diagnósticos, lo que conlleva a la utilización de antígenos no específicos de otros patógenos como *T. evansi*. Por tal razón en el presente trabajo se plantea el desarrollo de una metodología basada en la caracterización proteica y antigénica de *T. vivax* (herramienta bioquímica) y el empleo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (herramienta molecular) para obtener un diagnóstico confiable en las infecciones producidas por esta especie de *Trypanosoma*. Para el diagnóstico molecular fueron empleados "primers" especie-específicos de *T. vivax*; y para el desarrollo de la herramienta bioquímica, se utilizó el método de separación Tritón X-114 empleando geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes para discriminar entre las diferentes fracciones proteicas del parásito de acuerdo a su peso molecular, confrontándolas con las proteínas detectadas en *T. evansi* separadas por igual metodología. Las proteínas inmunogénicas detectadas al utilizar sueros de animales positivos a *T. vivax* y *T. evansi* evidenció la ausencia de reactividad cruzada entre ellos. El hallazgo de las proteínas antigénicas de 20, 31.5, 54 y 66 kDa presentes en *T. vivax* pueden ser utilizadas como marcadores específicos para su identificación y caracterización, permitiendo, asimismo, hacer diagnóstico diferencial en animales infectados con *T. evansi* y otros patógenos propios del ganado bovino. Haciendo uso de la herramienta molecular (PCR) y del análisis parasitológico (microcentrifugación, examen al fresco y frotis) se detectó un 2,7% (2/72 bovinos examinados) de infección por *T. vivax* en fincas de zonas ganaderas del Estado Mérida. Los animales positivos fueron analizados clínica, hematológica y serológicamente (valoración de analitos). El examen clínico evidenció ausencia de signos patognomónicos. Las pruebas hematológicas y los análisis de la química sanguínea confirman su valor en la evaluación del daño producido por *T. vivax*. Tomando en consideración los resultados obtenidos existe suficiente evidencia que demuestra a utilidad de las pruebas ensayadas para el diagnóstico certero de *T. vivax*.

Palabras claves: *T. vivax*, *T. evansi*, diagnóstico, Western blot, PCR.

TABLA DE CONTENIDO

	PAGINA
Resumen	1
Tabla de contenido	3
Introducción	5
Objetivos	13
Metodología	14
Resultados	24
Discusión	43
Conclusiones	51
Recomendaciones	53
Referencias bibliográficas	54
Anexos	62

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma (Duttonella) vivax Ziemann (1905), es el agente causal de una de las más importantes formas de tripanosomiasis detectadas en animales ungulados silvestres y domésticos entre los que se cuentan bovinos, búfalos, cabras, ovejas, camellos y ciervos (Tamasaukas y Roa, 1996) la cual se encuentra ampliamente distribuida en países tropicales y sub-tropicales de África, América y Asia (Sandoval y col., 1996). A pesar de la amplia gama de hospederos de *T. vivax*, es en el bovino donde el curso de la infección ha sido mayormente estudiado debido fundamentalmente a las implicaciones económicas (Seidl y col., 1999; Guillen y col., 2001).

T. vivax presenta características que permiten distinguirlo de otras especies pertenecientes a los subgéneros de la sección salivaria del género *Trypanosoma*. Las más resaltantes parecen ser su extraordinaria motilidad, cuando es examinado en preparaciones frescas y su monomorfismo en el mamífero (Hoare, 1972). Asimismo, ha sido señalado que aislados encontrados en los continentes africano y americano exhiben comportamientos distintos en cuanto a crecimiento en medios de cultivo y capacidad de infectar animales de laboratorio (Meléndez y Jiménez, 1979; Dirie y col., 1993).

Existe consenso sobre el mecanismo de transmisión vectorial de *T. vivax*, involucrándose, entre otros, dípteros hematófagos de los géneros *Glossina*, *Tabanus* y *Stomoxys* (McCabe y Clarkson, 1971; Hull, 1973; Foil, 1989; Otte y Abuabara, 1991), aunque también la transmisión puede ser llevada a cabo por especímenes de los géneros *Boophilus*, *Culicoides* y *Psilopelmia* (Cordovés y col., 1982; Rodríguez-Vivas y col., 2003); habiéndose señalado la transmisión transplacentaria en bovinos por algunos autores (Meléndez y col., 1993; González y Espinoza, 1994).

Corresponde a Léger y Vienne (1919) la descripción de *T. vivax* por vez primera en tierras americanas, señalando la presencia de esta especie de *Trypanosoma* en bovinos enfermos de un pueblo cercano a la capital de la Guyana Francesa y posteriormente, Tejera (1920) hace lo propio en Venezuela. Sucesivamente entre 1926 y 1995 fue descrito en diversas regiones de América incluyendo Guadalupe, Martinica, Colombia, Surinam, Panamá, Guyana, Brasil, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Paraguay, Perú y Bolivia (Kubes, 1944; Shaw y Lainson, 1972; Jones y Dávila, 2001). La tripanosomiasis por *T. vivax* pareciera un excelente ejemplo de que la introducción y propagación de un agente causal depende en gran medida de la intervención humana, la cual a través de la construcción de vías terrestres de comunicación, entre otros, ha permitido un incremento en el comercio de bovinos llevando con la actividad el establecimiento de la parasitosis en diferentes regiones (Silva y col., 1998).

En términos generales, los signos o síntomas producidos por *T. vivax* no son muy característicos, variando la presentación de la infección desde una forma aguda hasta crónica, pasando por estados completamente asintomáticos o de portador sano. Sin embargo, los principales signos clínicos detectados en pequeños y grandes rumiantes incluyen accesos febriles, asociados o no a la presencia del parásito en sangre circulante; además de emaciación, disentería, enflaquecimiento progresivo y anemia lo cual puede ocasionar la muerte (Clarkson y col., 1971; Toro y col., 1980; Silva y col., 1996). Asimismo, se señalan cambios en el comportamiento del animal, conjuntivitis, edema de la cabeza, abscesos subcutáneos, pelo erizado, cabeza caída, lagrimeo, reacción dérmica local, abortos, muerte neonatal, nacimientos débiles y trastornos endocrinos y fisiopatológicos en bovinos de ambos sexos (Mayaudon, 1979; González y Espinoza, 1994; Sandoval y col., 1995 a; Silva y col., 1996; García, 1997).

Desde el punto de vista hematológico, la disminución de los elementos formes de la sangre como eritrocitos, leucocitos y plaquetas es una característica de la tripanosomiasis bovina causada por *T. vivax* fundamentalmente durante las

primeras fases de la infección por lo que su estudio es un indicador confiable de la extensión o severidad de la hemoparasitosis lo que permite evaluar el estado fisiológico del animal (Dar y col., 1973; Davis, 1982; Silva y col., 1999).

Es escasa la investigación sobre las alteraciones en las pruebas exploratorias funcionales (Espinoza, comunicación personal). En bovinos no han sido señaladas alteraciones en los análisis que evalúan función hepática, renal y cardíaca cuando el animal es joven y se encuentra en buenas condiciones nutricionales (Schenk y col., 2001).

La severidad de la infección por *T. vivax* tiende a variar dependiendo de la virulencia del parásito, la susceptibilidad y el estado inmunitario del animal infectado (Anosa, 1983). La incidencia y prevalencia de la tripanosomiasis por *T. vivax* en bovinos pareciera estar relacionada con la presencia y densidad de los vectores. Asimismo, la presencia de bovinos enfermos o en estado de portador, animales que actúan como reservorios, malas condiciones de salud que predisponen a una fácil infección, manejo del rebaño que junto a las migraciones y movilizaciones de animales parecieran ser factores determinantes para su establecimiento (Gardiner, 1989; Seidl y col., 1999).

El primer impacto de tipo financiero que se observa en fincas donde circula *T. vivax* es la infertilidad que sufren los animales positivos al año siguiente de establecida la infección. La estimación de las pérdidas económicas se hace en base al número de animales afectados en el total de la población por finca, la duración del brote, mortalidad, abortos, gastos del tratamiento que no solo incluyen drogas tripanocidas sino también reconstituyentes y electrolitos; asistencia veterinaria, diagnóstico de laboratorio, retardo en el crecimiento, pérdida de la producción de leche, carne, cuero y energía de tracción (Duno, 1992; Márquez, 1997).

El diagnóstico de rutina para detectar infecciones por *T. vivax* es llevado a cabo utilizando métodos parasitológicos directos, confrontándose el inconveniente de que su sensibilidad decrece a medida que la infección tiende a la cronicidad; o la parasitemia es baja (De Almeida y col., 1997). De los métodos parasitológicos utilizados, el que ha mostrado los mejores resultados es la técnica de microcentrifugación cuando se le compara con el examen al fresco, el frotis, gota gruesa o punción ganglionar (Toro y col., 1979) presentando, asimismo, la ventaja de permitir la determinación del hematócrito, pudiéndose detectar posibles cuadros anémicos, convirtiéndose en un diagnóstico adicional (Wilson y col., 1973).

La utilización de columnas equilibradas de dimetilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) han sido útiles en el diagnóstico de campo de varias especies de *Trypanosoma* en regiones africanas, resultando fácil su ejecución, habiendo resultado de fácil accesibilidad económica (Lanham y Godfrey, 1970, Lumsden y col.; 1979). Sin embargo, presenta inconvenientes para *T. vivax* cuando el aislamiento se efectúa a partir de la sangre extraída directamente de un bovino quizás por la presencia de sustancias que actúan como inhibidores o por las cargas iónicas de la sangre de los bovinos incompatibles con la celulosa (Reyna, comunicación personal).

De los métodos serológicos más frecuentemente utilizados, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) han proporcionado los mejores resultados. Su principal deficiencia es que no permiten diferenciar entre infecciones recientes y pasadas. Además, la metodología no diferencia entre reacciones cruzadas con otros patógenos con los que *T. vivax* comparte similitud antigénica entre ellos *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma theileri* o con especies del género *Anaplasma*, hemoparásitos frecuentemente encontrados en rebaños bovinos (Desquesnes, 1997; Morlais y col., 2001). A pesar de ello, la similitud antigénica ha sido utilizada para realizar estudios epidemiológicos empleando extractos crudos de *T. evansi* para efectuar pruebas

antigénicas para detectar infecciones por *T. vivax* (Toro y col., 1985; Perrone y col., 1991; Tamasaukas y col., 1996; Espinoza y col., 1999 b; Morón, 2001). Esta práctica, aparentemente más común que lo esperado, podría generar inconvenientes en zonas ganaderas donde la tripanosomiasis equina por *T. evansi* también es endémica, pudiéndose atribuir reacciones positivas observadas a la presencia de *T. evansi* en bovinos en ausencia de *T. vivax* (Toro y col., 1980).

Las técnicas de biología molecular, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido revelar infecciones en animales sintomáticos o asintomáticos sin parasitemia detectable (Dirie y col., 1993). Sin embargo, su uso en diagnósticos de campo es limitado. Diferentes secuencias de ADN y ARN han sido diseñadas a partir de aislados africanos y americanos a fin de obtener mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico (Masiga y col., 1992; Desquenes y col., 2001; Ventura y col., 2001) situación que ha cobrado ventaja para estimar el riesgo de infección en ganado bovino empleando esta técnica junto a los sistemas de información geográficos (Duvallat y col., 1999).

En relación con la caracterización proteica de *T. vivax* y su utilidad inmunogénica pocos son los estudios desarrollados en este campo. En el presente, la mayoría de investigadores han utilizado la compatibilidad genética entre *T. evansi* y *T. vivax* para justificar el uso del antígeno en la elaboración de pruebas diagnósticas para la detección de tripanosomiasis por *T. vivax* debido a lo laborioso de aislar antígenos de *T. vivax* (Uzcanga y col., 2002).

La tripanosomiasis bovina es una enfermedad con amplia distribución en las regiones ganaderas tropicales y subtropicales del mundo constituyendo uno de los factores limitantes del desarrollo de ganaderías de alta productividad en estas zonas (Ñanez y col., 2001). En la aparición de la enfermedad, la influencia climática no parece ser un factor desencadenante. En época de lluvia, las infecciones son atribuidas a una mayor densidad vectorial (Tamasaukas y col., 1996) y en época de sequía, por la concentración de los rebaños dada la escasez

de oferta forrajera y agua en esta época (Espinoza y col., 1999 a, b). Situación similar es observada en cuanto al sistema de explotación al cual es sometido el animal bien sea doble propósito o con tendencia a la carne no mostrando diferencias estadísticas significativas (Duno, 1992; Morón, 2001).

BREVE RECUESTO HISTORICO SOBRE LA TRIPANOSOMIASIS BOVINA EN VENEZUELA

En Venezuela correspondió a Fernández (1931) (citado por Kubes, 1944), la primera reseña epidemiológica, realizando el primer estudio sobre las patologías que *T. vivax* ocasionó sobre el ganado bovino como consecuencia de un severo brote de tripanosomiasis ocurrido en tierras apureñas, el cual se mantuvo durante varios años afectando entidades vecinas y obligando al ejecutivo nacional a poner en práctica las primeras medidas restrictivas para el control de la infección. Los años 1931-1933 fueron quizás los más críticos por las numerosas bajas que experimentó la población bovina a causa de la infección por *T. vivax* principalmente en los estados Barinas, Portuguesa, Cojedes y parcialmente, Zulia. Pasado este trienio, la tripanosomiasis bovina no creó problemas serios, notándose a partir de 1942, una sensible disminución de los casos clínicos, con pequeños focos en los Estados Guárico, Anzoátegui, Portuguesa, Cojedes y Zulia (Kubes, 1944). Torrellas (1941) (citado por Rivera y García, 2001), señala la presencia de una clínica neurológica producto de la infección por *T. vivax* en bovinos de los distritos Mara y Páez del Estado Zulia. Faisson y col. (1948) (citado por Mayaudon, 1974), señalan el hallazgo de *T. vivax* en un venado cazado cerca de Mantecal en el Estado Apure, y refieren a este animal como potencial reservorio.

Importantes contribuciones en cuanto a descripción parasitaria, infección experimental, patología, diagnóstico y epidemiología fueron realizadas entre 1940 a 1950 por Kubes (1944), Vogelsang y Gallo (1950, 1951) (citado por Rivera y García, 2001). Posteriormente, el estudio por esta entidad nosológica cae en el

olvido hasta que se detectan seroprevalencias entre el 10 y el 15% en el estado Zulia señalando como principales signos en los animales enfermos anemia y emaciación (Clarkson y col., 1971). Por su parte, Díaz-Ungría y Maldonado (1972), señalan la presencia de *T. vivax* entre los rebaños bovinos de los Estados Zulia y Mérida.

Un nuevo silencio epidemiológico fue notado durante la década 1970 -1980, cuando fueron detectados en diversas regiones del país seroprevalencias de 25,5% y 20,8% con altas incidencias en bovinos de diferentes edades, razas y tipos de explotación (Toro y col., 1980; Toro, 1990). A partir de la década de los noventa, aumentan las investigaciones tendientes a revelar la realidad sobre la infección por *T. vivax* en diferentes zonas ganaderas del país, revelándose, además, su presentación en los sistemas de explotación, en las diferentes razas, sexo y edad de los animales expuestos a los factores de riesgo de transmisión. En este contexto, en Santa María de Ipire se detecta 55% de seroprevalencia en bovinos mayores de 36 meses (Perrone y col., 1991) y 57,8% en ganado distribuido en el eje Mirimare-Yaracal con 1% de infección activa (Duno, 1992). Un 3,9% de prevalencia parasitaria es señalado para la región centro norte del país (Tamasaukas y col., 1996). En tres municipios del estado Bolívar 20% de seroprevalencia (Espinoza y col., 1999 b) y 48,69% para el estado Trujillo (Morón, 2001). Además de los reportes señalados, brotes aislados o pequeños focos han sido hallados por diferentes grupos de investigadores en diferentes regiones ganaderas del país con un alto porcentaje de infección activa, altas tasas de mortalidad, bajas en la producción e incluso la muerte del animal (Rivera y García, 2001).

A pesar de los aportes realizados para demostrar la distribución de la tripanosomiasis en bovinos de diferentes edades, razas y tipos de explotación, en el presente, el interés por la investigación sobre *T. vivax* continúa siendo escaso (Rivera, 1996). Esta circunstancia ha traído como consecuencia que en muchas

zonas ganaderas entre ellas la región Sur del Lago de Maracaibo, la comprensión de su verdadera epizootiología y el verdadero papel que juega como limitante de la producción bovina sean restringidos. Aunado a esto se halla la frecuente movilización de ganado sin el debido control sanitario, lo que podría predisponer a un aumento en el riesgo de transmisión. El problema pareciera complicarse debido al fácil acceso que tienen los ganaderos a las drogas tripanocidas, las cuales son usadas indiscriminadamente para tratar bovinos en diferentes estados de la infección o cuando se sospecha la misma, pudiéndose provocar con esta práctica problemas de resistencia en los rebaños y perdiéndose, a su vez, valiosa información de interés epizootiológico (Jones y Dávila, 2001; Guillen y col., 2001). Lo anterior pareciera agravarse debido a la inexistencia de un método diagnóstico confiable que permita detectar la verdadera proporción de los animales infectados.

Por las razones expuestas, proponemos el desarrollo de una metodología basada en la caracterización proteica de la forma sanguícola de *T. vivax* mediante aislamiento de proteínas específicas del parásito y el empleo de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que junto a técnicas parasitológicas, hematológicas y valoración de analitos séricos permitan un diagnóstico confiable, específico e integral para detectar las infecciones producidas por este protozoo en el ganado bovino y que a su vez reflejen la real prevalencia de la tripanosomiasis en el área.

OBJETIVOS

GENERALES

- 1.- Obtener proteínas inmunogénicas de las formas sanguíneas de *T. vivax* que permita el diagnóstico especie-específico de las infecciones causadas por esta especie de *Trypanosoma* en el ganado bovino (diagnóstico bioquímico).
- 2.- Detectar la presencia de *T. vivax* en muestras sanguíneas de bovinos provenientes de un área ganadera de Mérida mediante la utilización de métodos parasitológicos y moleculares (PCR) que junto con el diagnóstico bioquímico permitan estimar la prevalencia de las infecciones producidas por *T. vivax*.

ESPECÍFICO

- 1.- Estimar los parámetros hemáticos incluyendo hemoglobina, hematócrito, cuenta eritrocitaria, cuenta plaquetaria, cuenta y fórmula blanca y valorar algunos analitos séricos como glicemia, creatinina, TGP, TGO y proteínas, en bovinos muestreados en áreas endémicas, relacionando los valores de la bioquímica sanguínea con la infección por *T. vivax*.

METODOLOGÍA

1. DIAGNÓSTICO BIOQUÍMICO

1.1. Detección de proteínas inmunogénicas especie-específicas de las formas sanguíneas de *T. vivax*

1.1.1 Aislamiento y purificación de *T. vivax*

Siguiendo la metodología descrita por González y col. (2002), se procedió a inocular por vía intravenosa, a un ejemplar ovino, macho de 6 meses de edad y 12 Kg de peso, inyectándole, previa inmunosupresión con 5 inyecciones interdiarias de dexametasona, 1,3 ml de un criopreservado de *T. vivax* (cepa Liem-176) conteniendo $1,7 \times 10^6$ parásitos. Cuando la parasitemia hubo alcanzado su pico máximo: Woo (+++) y 1×10^9 parásitos/ μ l, el animal fue sangrado punzando la vena yugular con aguja calibre 19_g x 1½" previa asepsia de la zona, tomando 100 ml de sangre en una fiola conteniendo EDTA 15% como anticoagulante. La sangre fue mezclada con un volumen igual de percoll (densidad 1,130 g/ml) en el cual previamente fueron disueltos 8,5% de sacarosa y 2% de glucosa ajustando el pH a 7,4 con HEPES sódico. La suspensión fue centrifugada a 17.500 g durante 20 min a 4 °C a fin de obtener tres fases bien diferenciadas. La fase superior junto a la intermedia fueron colectadas en un tubo Falcom y resuspendidas en tres volúmenes de solución tampón fosfato salino glucosado (PBSG) preparado con 0,2 M de NaH_2PO_4 , 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 M NaCl y 1% de glucosa ajustando pH a 7,5 y centrifugando a 5.000 g a 4 °C durante 15 min. El sedimento conteniendo los parásitos fue resuspendido en PBSG y cromatografiado lentamente a través de una columna de DEAE-celulosa según Lanham y Godfrey (1970) equilibrada con el mismo buffer. De esta manera, los parásitos fueron obtenidos puros y libres de células sanguíneas.

El tubo donde fueron recolectadas las formas sanguíneas de *T. vivax*, fue centrifugado a 5.000 g durante 15 min a 4 °C y el pellet resuspendido en 2 ml de PBSG para proceder al conteo parasitario por el método de Pizzi (1957)

modificado por Brener (1961) para posteriormente centrifugar a 14.000 g por 30 seg, desechando el sobrenadante y guardando el pellet a -40°C hasta su uso.

1.1.2. Fraccionamiento de proteínas de *T. vivax* por el método del Tritón X-114

El fraccionamiento proteico fue realizado siguiendo la metodología descrita por Ko y Thompson (1995). Para ello fueron pesados y disueltos en agua destilada 0,06 g de un pool de inhibidores de proteasas Complete™-Roche añadiéndose al concentrado de parásitos previamente diluido en 500 μl de buffer 1 (tris-HCl 0,1 M, NaCl 1,5 M, 2% Tritón X-114, pH 7,4) y con este mismo buffer, se llevó a un volumen final de 2 ml. La mezcla fue agitada a 4°C durante 1 hora y bajo esta misma condición, fue centrifugada durante 10 min a 7.200 g, congelando el sobrenadante por 24 horas y lavando el precipitado con buffer 2 (tris-HCl 0,1 M, NaCl 1,5 M, 0,06% Tritón X-114, pH 7,4) llevando hasta un volumen final de 1,5 ml para luego centrifugar durante 10 min a 14.000 g. El precipitado resultante fue guardado a -20°C identificándose como primer precipitado (F1). Esta fracción contiene las proteínas de membrana que no solubilizan con el Tritón X-114. El sobrenadante congelado fue mantenido a 4°C y se le realizó una primera partición: 10 min a 35°C y 3 min de centrifugación a 2.600 g y 25°C . Esta partición permitió separar la fase acuosa de la fase detergente. La fase acuosa fue colocada en un tubo de centrifuga que fue mantenido en hielo y a la fase detergente, le fue añadido 2 volúmenes de buffer 2 y mantenido en frío durante 15 min para luego realizarle una segunda partición. La fase acuosa resultante se dispensó en el tubo de centrifuga mantenido en hielo, y se le añadió $3 \frac{1}{2}$ volúmenes de acetona fría congelando a -20°C durante 24 horas.

La fase detergente fue mezclada con 3 volúmenes de buffer 2, manteniéndose en hielo durante 10 min para luego centrifugar en frío por este mismo tiempo a 14.000 g. El pellet fue congelado e identificado como segundo precipitado (F2), el cual contiene proteínas de membrana no ancladas por GPI. Al sobrenadante se le realizó una tercera partición, añadiendo a la fase detergente obtenida, 3

volúmenes de acetona fría y congelándola durante 24 horas como GPI, es decir, proteínas de membrana ancladas por glicosil-fosfatidil-inositol (F3). Transcurrido este tiempo, se sometió a una centrifugación a 14.000 g durante 7 min a 4°C, descartando el sobrenadante y secando bien el pellet. El tubo donde fueron recolectados los sobrenadantes, fue centrifugado durante 10 min a 14.000 g y el pellet secado a 37 °C rotulándolo como sobrenadante (F4). En esta fracción se concentran las proteínas citoplasmáticas hidrofílicas.

A las fracciones F1 conteniendo las proteínas de membrana insolubles al Tritón X-114, F2 que contiene proteínas de membrana no ancladas por GPI, F3 con proteínas de membrana ancladas por GPI y F4 conteniendo proteínas de citoplasma, se les añadió 50 µl de buffer sample (62 mM Tris-base, 2% SDS, 10% glicerol, azul de bromofenol, pH 6,8), homogeneizando muy bien y congelando a –20 °C hasta el momento de su uso.

1.1.3. Detección de proteínas en fracciones de *T. vivax*

1.1.3.1. Electroforesis

Las fracciones de *T. vivax* fueron sometidas a un proceso de electroforesis utilizando geles de poliacrilamida preparados al 12% según procedimiento descrito por Laemmli (1970). Para ello, las muestras fueron tratadas bajo condiciones desnaturalizantes, depositando un volumen conocido de cada fracción (15 µl) en un tubo eppendorf y añadiéndole dodecil sulfato de sodio (SDS), 0,5 M de DTT (dithiothreitol) y calentando en baño de agua a 90 °C durante 3 min. La electroforesis fue realizada a un voltaje constante de 100 v/cm durante 1 ½ hora en un sistema de Mini-Protean II (Bio-Rad) acoplado a una fuente de poder Hoefer y utilizando buffer de corrida 1X preparado con 0,25 M de tris base, 1,9 M de glicina, 1% SDS y agua destilada en c.s.p 1 litro. El marcador de peso molecular empleado presentó un rango entre 20.5 y 111.0 kDa. Una vez concluida la electroforesis, se procedió a la coloración de uno de los geles con azul de Coomasie preparado con 10% de ácido acético glacial, 50% de metanol y 0,25 g de azul de Coomasiee R250. La coloración fue seguida durante 30 min, utilizando

posteriormente solución decolorante conteniendo metanol al 5% y ácido acético glacial al 10%.

1.1.3.2. Transferencia de proteínas en geles de poliacrilamida a membranas de PDVF

Los geles no teñidos conteniendo 5 µl de proteínas de las fracciones F1, F2, F3 y F4 y 1,5 µl de DTT fueron transferidos a membranas de PDVF (polyvinylidene difluoride) Inmobolon P, utilizando un equipo de transferencia húmedo en un sistema de Mini Protean II (Bio-Rad) y buffer 1X (Winston y col., 1987). El buffer 1X fue preparado con 100 ml de buffer transferencia 10X (0,25 M tris base y 1,9 M de glicina para 1 litro), 200 ml de metanol y agua destilada en c.s.p 1 litro de solución. La transferencia fue realizada aplicando una corriente de 100 v/cm durante 2 horas o 30 v/cm toda la noche a 4 °C y las membranas fueron guardadas a 4 °C para su uso posterior en la inmunodetección de antígenos.

1.1.3.3. Inmunodetección por Western blot de antígenos unidos a la membrana de *T. vivax*

Las membranas mantenidas en refrigeración fueron permeabilizadas en alcohol durante 5 min y posteriormente fueron lavadas con solución de TBS 1X (preparada a partir de TBS 10X) por el mismo tiempo. La solución TBS 10X fue preparada para 1 litro con 12 g de tris-base y 88 g NaCl a pH 8.0. Luego del lavado, se procedió al bloqueo con leche descremada al 5% en TBS 1X durante 14 horas con agitación continua en un horno de hibridación a 25°C. Posterior al bloqueo, las membranas fueron sometidas a tres lavados de 10 min cada uno con TBS 1X, para reemplazar por una solución al 1% de leche descremada preparada en la misma solución, que contenía al anticuerpo primario constituido por suero de bovino positivo a *T. vivax* en dilución 1:100, agitando lentamente en el horno durante 2 horas a 25°C para luego realizar tres lavados. El suero positivo a *T. vivax* fue gentilmente cedido por el Dr. F. García de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela. Luego de los lavados, se procedió a agregar el anticuerpo secundario constituido por conjugado anti-bovino

marcado con peroxidasa en dilución 1:10.000 preparado en solución al 1% de leche descremada en TBS 1X incubando durante 2 ½ horas. Posterior a ello, fueron realizados tres lavados finales para proceder al revelado con peróxido de hidrógeno como sustrato y 4-cloro-1-naphthol como elemento cromógeno en 10 ml de TBS 1X y 2 ml de metanol, deteniendo la reacción luego de 5-10 min lavando las membranas con agua destilada.

1.2. Detección de proteínas inmunogénicas especie-específicas de las formas sanguíneas de *T. evansi*

Por la similitud antigénica con *T. vivax* y siguiendo la metodología antes descrita, fue realizado el fraccionamiento y detección proteica a un pellet de formas sanguíneas de *T. evansi* cedido muy gentilmente por la Dra. Trina Perrone del Laboratorio de Inmunología, Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez. El pellet fue obtenido al infectar experimentalmente ratas albinas con un aislado de *T. evansi* obtenido de chigüire (*Hydrochoerus hydrochoerus*) procedente del Estado Apure y purificado según Lanham y Godfrey (1970). La carga parasitaria fue contabilizada en $1,5 \times 10^9$ tripanosomas/ml.

2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

2.1. Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.1.1. Preparación de las muestras para la estandarización de la técnica de PCR

Las muestras a ensayar en la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa fueron sangre venosa anticoagulada, sangre recogida sobre papel de filtro, frotis sanguíneo y suero, todas provenientes de un ovino inoculado con *T. vivax* bajo condiciones experimentales. Cada muestra fue tratada con 200 µl de buffer de lisis (0,1 M tris HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5), 20 µl de chelex-iron y 5 µl de proteinasa K, incubándolas durante 1 hora a 62 °C y luego 15 min en baño de agua a 100°C para desactivar la proteinasa K. Cada muestra fue centrifugada a 15.000 g durante 15 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf para proceder a la extracción volumen/volumen con fenol-cloroformo-alcohol

isoamílico (25:25:1) centrifugando a 15.000 g durante 2 min. El sobrenadante fue dispensado a otro tubo al cual le fue añadido 3 volúmenes de alcohol absoluto en frío preservando la reacción a -40 °C durante 24 horas. Luego de este tiempo, se centrifugó durante 15 min a 15.000 g, descartando el alcohol y dejando secar el precipitado a temperatura ambiente, lavando con 3 volúmenes de alcohol 70% y secando a 35 °C por 20 min. El ADN obtenido fue resuspendido en 30 µl de agua destilada mega pura estéril y almacenado a -20 °C.

2.1.2. Mezcla de reacción y condiciones de ciclaje

La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada utilizando la metodología descrita por Ventura y col. (2001). Los primers TviSL1 y TviSL2 fueron cedidos gentilmente por la Dra. M. M. G. Teixeira del Instituto de Ciencias Biomédicas, Laboratorio Diagnóstico Taxonomía y Filogenia Molecular de *Trypanosomatidae* de la Universidad de Sao Paulo, Brasil. La secuencia, localización y fragmento amplificado de los primers empleados son mostrados en la tabla 1. La mezcla de reacción fue preparada en un volumen final de 50 µl conteniendo buffer taq 10X; 1,5 mM MgCl₂; 200 µM de dNTPs; 20 µM de cada primers; 5 U/µl de enzima taq polimerasa y 0,1 mg/ml de leche descremada. La reacción de amplificación fue realizada en 35 ciclos de 94 °C (1 min), 65 °C (2 min) y 72 °C (3 min) seguido de un tiempo de extensión final de 72 °C (10 min).

Tabla1. Primers utilizados en la prueba de PCR

Primers	Secuencia 5' ->3'	Localización	Fragmento Amplificado	Uso y referencia
TviSL1	GCTCTCCAATCTTAACCCTA	Región intergénica del gen SL de <i>T. vivax</i>	210 pb	Diagnóstico Ventura y col., 2001
TviSL2	GTTCCAGGCGTGCAAACGTC			

2.1.3. Corrida electroforética

El producto de PCR fue corrido en geles de agarosa al 2%, utilizando TBE 1X (tris-borato-EDTA) como buffer de corrida, preparado a partir de TBE 10X (109 g tris-base, 55,6 g de ácido bórico y 5,8 g EDTA). Los geles fueron coloreados con bromuro de ethidium (1 mg/ml), examinados bajo luz ultravioleta y fotografiados con una cámara KODAK 290.

3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HEMÁTICOS PARA LA DETECCIÓN DE POSIBLES ALTERACIONES EN LAS DIFERENTES LÍNEAS CELULARES SANGUÍNEAS PRODUCTO DE LA ACCIÓN DE *T. vivax*

3.1. Estimación de los niveles de hemoglobina

Para la determinación cuantitativa de la hemoglobina se empleó el método de la cianometahemoglobina, añadiendo 20 µl de la sangre problema a 5 ml del reactivo comercial de Drabkin (Bioscience), pasados 5 min, se realizó la lectura a 540 nm. El valor obtenido en densidad óptica se convirtió a g/dl de hemoglobina multiplicando por el factor de calibración del lector.

3.2. Estimación de los niveles de hematócrito

Realizado por medio de la técnica del microhematócrito, procediendo al llenado de capilares de vidrio con la sangre y sellado de uno de los extremos con plastilina, para posteriormente centrifugar (microcentrifuga Clay Adams, Autocrit Ultra 3) a 16.500 g durante 10 min, empleando un lector especial para la lectura que se expresó en porcentaje.

3.3. Estimación de la cuenta globular roja

La sangre problema se diluyó 1:200 con el reactivo de Gower's (12,5 g de sulfato de cobre anhidro y 33,3 ml de ácido acético glacial en un volumen final de 200 ml). Se llenó una cámara de Neubauer con la dilución y dejando reposar por 5 min para dar tiempo a que sedimentaran los glóbulos, se procedió al conteo con

objetivo de 40X, multiplicando por 10.000 los eritrocitos observados en los 4 cuadrantes medianos de las esquinas.

3.4. Estimación de plaquetas

El conteo se realizó por el método de Brecher-Concrite, agregando 20 μ l de la sangre problema a un vial de DIAGNOPETTE (1980 μ l). Luego de llenar una cámara de Neubauer y reposar por 10 min, se contaron con objetivo de 40X todas las plaquetas observadas en el cuadrante central de la cámara. El número total se multiplicó por 1.000.

3.5. Determinación de la cuenta globular blanca

Luego de mezclar repetidamente por inversión la sangre a fin de lograr una distribución homogénea de los leucocitos, se empleó el líquido de Türk (Bioscience) para realizar una dilución 1:20 con la sangre problema y luego de llenar una cámara de Neubauer y reposar durante 2 min, utilizando el objetivo de 10X los glóbulos observados fueron contados en los cuatro cuadrantes de las esquinas y el cuadrante central multiplicando por 40 el resultado.

3.6. Determinación de la fórmula blanca

Los frotis sanguíneos obtenidos, luego de fijados con metanol durante 5 min, fueron coloreados con Giemsa en dilución 1:10 durante 30 min para diferenciar posteriormente con objetivo de 100X los leucocitos presentes.

4. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DE *T. vivax* EN MUESTRAS SANGUÍNEAS DE BOVINOS

Para tal fin fueron empleados los métodos de microcentrifugación (microhematócrito), examen al fresco y frotis sanguíneo delgado.

La microcentrifugación fue realizada posterior a la determinación del hematócrito, colocado el capilar de vidrio sobre la platina del microscopio y utilizando objetivos

de 10X, 25X y 40X se procedió a observar la interfase entre la capa de leucocitos y plasma en busca de parásitos. El examen al fresco fue realizado depositando 5 µl de sangre sobre una lámina portaobjeto y cubriendo con una laminilla la preparación fue observada al microscopio con objetivos de 25X y 40X para la búsqueda de la forma sanguínea del parásito. El frotis sanguíneo utilizado para el recuento diferencial fue igualmente empleado para la búsqueda de tripomastigotes de *T. vivax*.

5. DETERMINACIÓN DE QUÍMICA SANGUÍNEA PARA VALORAR POSIBLES ALTERACIONES EN ALGUNOS ÓRGANOS Y SISTEMAS PRODUCTO DE LA ACCIÓN DE *T. vivax*

Para la valoración de los parámetros químicos: glicemia, creatinina, transaminasa pirúvica (TGP), transaminasa oxaloacética (TGO), proteínas totales y fraccionadas (albúmina y globulinas) fueron empleados kits comerciales y los sueros conservados a -40 °C utilizados según especificación de los mismos.

6. DETECCIÓN DE INFECCIONES POR *T. vivax* EN GANADO BOVINO DE ÁREAS GANADERAS DE MÉRIDA

6.1. Área de estudio

El Municipio Alberto Adriani ubicado al oeste de la capital del Estado Mérida entre el pie de monte andino y la depresión de la cuenca del Lago de Maracaibo entre las coordenadas 8°20'36" y 8°40'12" de latitud norte y los 71°30'20" y 71°45'05" de longitud oeste, fue escogido como área de estudio para la detección de infecciones por *T. vivax* dada su jerarquía de zona ganadera térmica cálida y húmeda.

6.2. Características de las fincas

Para la caracterización de las fincas se diseñó un formulario que permitió la clasificación según ubicación, superficie, tipo de explotación, sistema de producción; población bovina existente considerando raza, edad, sexo, condición y seguimiento sanitario. Detalles sobre el formulario se presentan en el anexo 1.

6.3. Características de la población bovina

Los animales incluidos en el muestreo fueron seleccionados con ayuda de un médico veterinario quien inspeccionó sobre su estado clínico. El uso de un formulario permitió realizar anotaciones referentes a la edad, sexo, raza, procedencia, antecedentes de tripanosomiasis y estado clínico para el momento del muestreo (anexo 2).

6.4. Recolección y conservación de las muestras

Previa asepsia se procedió a realizar punción de la vena yugular de cada animal utilizando aguja 19_g x 1½ e inyectora de 20 ml y recogiendo la sangre según el siguiente patrón:

a) 13 ml en tubos Falcom con citrato de sodio al 3,8% en dilución 1:9 para estudios parasitológicos directos y molecular (PCR).

b) 3 ml en tubos vacutainer con una gota de EDTA (reactivo comercial) para estudios hematológicos.

c) 4 ml en tubos vacutainer para recolectar suero utilizado en los estudios bioquímicos (Western blot) y valoración de analitos.

Las muestras debidamente rotuladas fueron transportadas en frío lo más pronto posible al laboratorio para los análisis respectivos.

RESULTADOS

1. DESARROLLO DE HERRAMIENTA BIOQUÍMICA PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIONES POR *T. vivax*

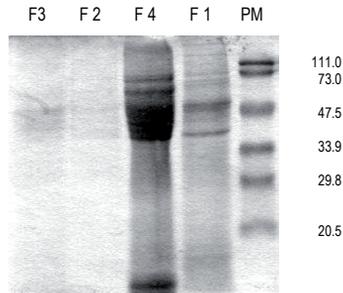
1.1. Detección de proteínas para *T. vivax*

El proceso de aislamiento y purificación de *T. vivax* a partir de la muestra sanguínea utilizada arrojó un rendimiento de 2×10^7 tripomastigotos/ml. Asimismo, el patrón de corrida electroforética de cada fracción en geles de poliacrilamida permitió visualizar una mayor concentración proteica en las muestras correspondientes a las proteínas del citoplasma (F4) y las de membrana no solubilizadas por Tritón X-114 (F1). Muy pocas proteínas fueron visualizadas en las muestras correspondientes al resto de las fracciones de proteínas de membrana (F2 y F3). El patrón proteico detectado en F4 fue ubicado entre los 33,9 y 73,0 kDa de peso molecular, con dos bandas bien diferenciadas sobre los 47,5 kDa. El patrón desarrollado por F1 reveló dos bandas diferenciadas entre los 33,9 y 47,5 kDa. Detalles de la expresión proteica en cada una de las muestras utilizadas y su correspondiente peso molecular se muestran en la figura 1.

1.2. Detección de proteínas para *T. evansi*

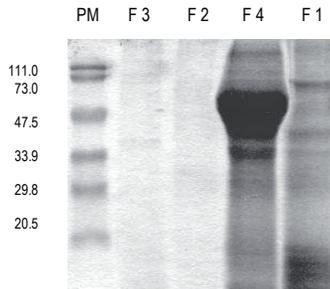
El patrón proteico detectado en las muestras de *T. evansi* mostró similitud con las fracciones de proteínas obtenidas por *T. vivax*. Sin embargo, fue posible obtener diferencias notables entre las fracciones. Las proteínas citoplasmáticas de *T. evansi* (F4) fueron concentradas entre los 47,5 y 73,0 kDa con una banda bien diferenciada sobre los 33,9 kDa y para las proteínas de membrana no solubilizadas por Tritón X-114 (F1) las bandas se concentraron entre los 33,9 y 73,0 kDa. En la figura 2 se muestran los detalles sobre el peso molecular de las fracciones reveladas en cada caso.

FIGURA 1. FRACCIONAMIENTO PROTEICO Y DETECCIÓN DE FRACCIONES DE PROTEÍNAS PARA *T. vivax*



F3: proteínas de membrana ancladas por GPI; F2: proteínas de membrana no ancladas por GPI; F1: proteínas de membrana no solubilizadas por Tritón X-114; F4: proteínas de citoplasma. PM: marcador de peso molecular

FIGURA 2. FRACCIONAMIENTO PROTEICO Y DETECCIÓN DE FRACCIONES DE PROTEÍNAS PARA *T. evansi*

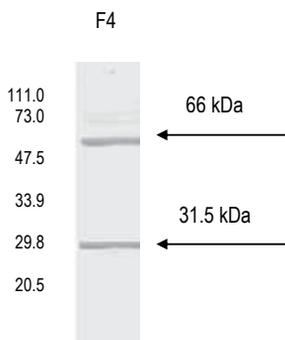


F3: proteínas de membrana ancladas por GPI; F2: proteínas de membrana no ancladas por GPI; F1: proteínas de membrana no solubilizadas por Tritón X-114; F4: proteínas de citoplasma. PM: marcador de peso molecular

1.3. Caracterización inmunológica del patrón proteico desarrollado por *T. vivax*

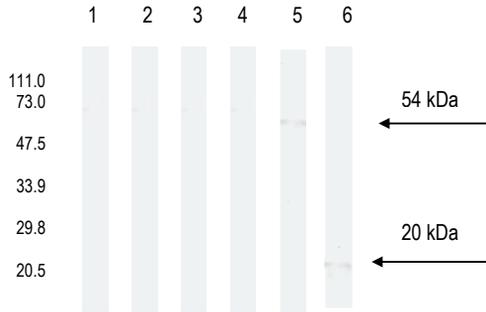
La utilización del Western blot para realizar las pruebas de antigenicidad sobre las proteínas citoplasmáticas de *T. vivax* reveló dos bandas bien diferenciadas de peso molecular aproximado de 66 y 31.5 kDa (figura 3). Con el mismo fin fue empleada la técnica del Western blot en las fracciones restantes de *T. vivax* observándose respuesta antigénica solo para las proteínas de membrana no solubilizadas por el Tritón X-114 en presencia y ausencia del agente reductor (DTT). Las bandas se revelaron con menor intensidad que para la fracción citoplasmática y correspondieron a bandas de 54 kDa (en presencia del DTT) y 20 kDa (en ausencia de DTT) de peso molecular (figura 4).

FIGURA 3. WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE *T. vivax* EN LA FRACCIÓN PROTEICA CITOPLASMÁTICA



Proteínas de la fracción citoplasmática de *T. vivax* (F4) reveladas con suero de bovino positivo a *T. vivax*. El pozo contiene 5 μ l de proteínas, 1,5 μ l de DTT y 10 μ l de buffer sample

FIGURA 4. WESTEN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS ESPECÍFICOS DE *T. vivax* EN LAS FRACCIONES PROTEICAS DE MEMBRANA



1y 2: proteínas de membrana ancladas por GPI; 3 y 4: proteínas de membrana no ancladas por GPI; 5 y 6: proteínas de membrana no solubilizadas por Tritón X-114.

1,3,5: cada pozo contiene 5 µl de la fracción proteica de *T. vivax*, 1,5 µl de DTT y 10 µl de buffer sample; 2,4,6: cada pozo contiene 5 µl de la fracción proteica de *T. vivax* y 10 µl de buffer sample

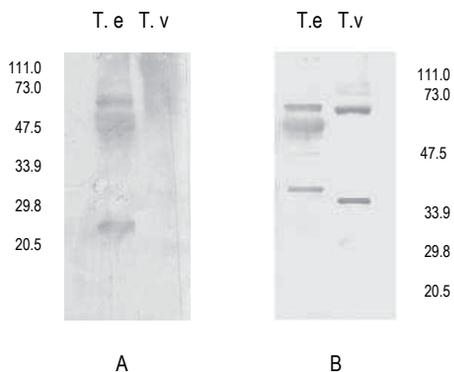
Las proteínas de membrana de la fracción proteica F1 fueron enfrentadas con sueros de bovinos positivos a *Anaplasma marginale*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis* y suero de equino positivo a *T. evansi* no evidenciándose respuesta antigénica.

1.4. Caracterización inmunológica entre las proteínas citoplasmáticas de *T. vivax* y *T. evansi*

Las proteínas citoplasmáticas de *T. vivax* y *T. evansi* fueron confrontadas con sueros de bovino y equino positivo a *T. vivax* y *T. evansi* respectivamente. Este ensayo permitió revelar proteínas de *T. evansi* en presencia del suero de bovino positivo a *T. vivax* (bandas de 46 y 70 kDa principalmente) y proteínas de *T. evansi* en presencia de suero de equino positivo a *T. evansi* (bandas de 62 y 24 kDa). Asimismo, se revelaron proteínas de *T. vivax* en presencia del suero de

bovino positivo a *T. vivax* (bandas de 31,5 y 66 kDa). Sin embargo, no se revelaron bandas inmunogénicas de *T. vivax* cuando estas fueron confrontadas con suero de equino positivo a *T. evansi*. Detalles de la expresión inmunogénica entre *T. vivax* y *T. evansi* son mostrados en la figura 5 y tabla 2.

FIGURA 5. WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS EN LAS FRACCIONES CITOPASMÁTICAS DE *T. vivax* Y *T. evansi*



T.e: fracción proteica F4 de *T. evansi*; T.v: fracción proteica F4 de *T. vivax*.
A: fracciones F4 de T. e y T.v reveladas con suero de equino positivo a *T. evansi*
B: fracciones F4 de T.e y T.v reveladas con suero de bovino positivo a *T. vivax*

Tabla 2. Inmunogenicidad de la fracción proteica citoplasmática de *T. vivax* y *T. evansi* enfrentada a sueros positivos de bovino y equino

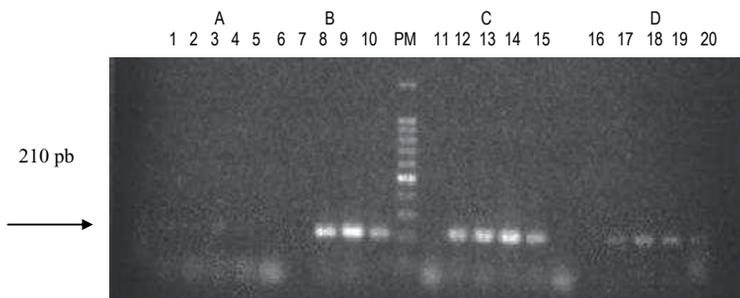
Proteínas	suero bovino positivo <i>T. vivax</i>	suero equino positivo <i>T. evansi</i>
<i>T. vivax</i>	31,5 kDa 66 kDa	-
<i>T. evansi</i>	46 kDa 70 kDa	24 kDa 62 kDa

2. UTILIZACIÓN DE HERRAMIENTA MOLECULAR (PCR) PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIONES POR *T. vivax*

2.1 Estandarización y especificidad de la reacción

El procesamiento al cual fueron sometidas las distintas condiciones de la sangre control permitió la escogencia de la muestra buffy coat para los estudios moleculares por su reproducibilidad bajo distintas condiciones de ensayo. En este contexto, el ensayo identificado con el número 13 (preparación de la muestra C y mezcla de reacción F) resultó más confiable (figura 6). Las muestras en lámina y papel de filtro mostraron señal cuando fueron sometidas a algunos de los ensayos (figura 7). Igual comportamiento se obtuvo para la muestra de suero.

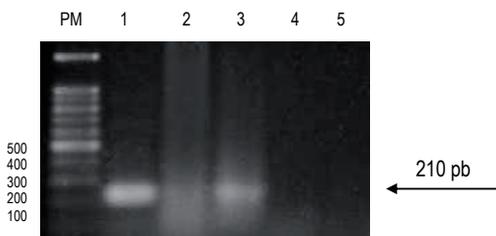
FIGURA 6. ESTANDARIZACIÓN PCR. MUESTRA: SANGRE VENOSA (buffy coat).



Preparación de la muestra: A (1-5): buffy coat + proteinasa K; B (6-10): buffy coat + proteinasa K + chelex; C (11-15): buffy coat + proteinasa K + buffer de lisis + chelex; D (16-20): buffy coat + proteinasa + buffer de lisis

Mezcla de reacción: 2,7,12,17 (E): PCR Ventura y col. (2001). 3,8,13,18 (F): PCR Ventura y col. (2001) + 2 mg/ml BSA. 4,9,14,19 (G): PCR Ventura y col. (2001) + 0,1 g/ml leche descremada. 5,10,15,20 (H): PCR Ventura y col. (2001) + 2 mg/ml BSA + 0,1 g/ml leche descremada. 1,6,11,16: H₂O

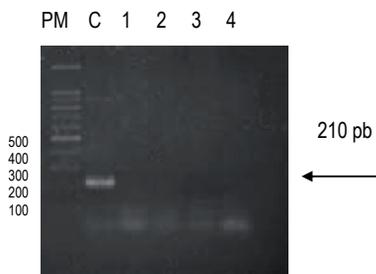
FIGURA 7. ESTANDARIZACIÓN PCR PARA MUESTRAS DE BUFFY COAT, LÁMINA, PAPEL DE FILTRO Y SUERO



Material genético contenido en: 1: buffy coat; 2: lámina; 3: papel de filtro y 4: suero; 5: control de reacción

La especificidad de la reacción de PCR fue comprobada utilizando muestras sanguíneas de bovinos positivos a *A. marginale*, *M. bovis*, *M. paratuberculosis* y de equino positivo a *T. evansi* no revelándose señal a nivel de 210 pb. De igual modo, sangre de bovinos provenientes de la denominada zona alta del Estado Mérida, catalogada como área no endémica para la tripanosomiasis bovina no reveló señal, siendo utilizados como controles negativos (figura 8).

FIGURA 8. PCR PARA MUESTRAS SANGUÍNEAS DE BOVINOS PROVENIENTES DE ZONA GANADERA NO ENDÉMICA PARA *T. vivax*



C: ADN genómico. 1-4: muestras sanguíneas de bovinos provenientes de áreas no endémicas

3. DETECCIÓN DE INFECCIONES POR *T. vivax* EN BOVINOS DE FINCAS GANADERAS DE MÉRIDA

3.1 Características de las fincas visitadas

En total fueron visitadas 7 fincas ubicadas en la zona de estudio, 4 pertenecientes a la parroquia Héctor Amable Mora, 2 a la parroquia José Antonio Páez y 1 a la parroquia Rómulo Betancourt. Datos referentes a superficie, sistema y tipo de explotación y raza ganadera predominante son mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Características de las fincas ganaderas incluidas en el estudio

Nº finca	Ubicación (parroquia)	Superficie (Ha)	Sistema de explotación	Tipo de explotación	Raza predominante
1	R. Betancourt	98	Semi-intensiva	Leche	Mestizo-cebú
2	H.A. Mora	91	Semi-intensiva	Doble propósito ^(*)	Mestizo
3	H.A. Mora	70	Semi-intensiva	Doble propósito ^(*)	Mestizo-cebú
4	H.A. Mora	77	Semi-intensiva	Doble propósito ^(*)	Mestizo
5	H.A. Mora	45	Semi-intensiva	Doble propósito ^(*)	Mestizo-cebú
6	J.A. Páez	70	Semi-intensiva	Leche	Mestizo-Holstein pardo
7	J.A. Páez	35	Semi-intensiva	Leche	Mestizo-Holstein cebú

(*) doble propósito con tendencia a la leche

Los productores manifestaron cumplir con los programas sanitarios de rutina exigidos. A pesar de que ningún productor manifestó haber tenido entre su ganado antecedentes de hemoparásitos, 2 afirmaron haber instaurado tratamiento preventivo a algunos bovinos 4 meses previos al estudio utilizando babesil® y tripagan®.

3.2. Características de la población bovina muestreada

El total de la población bovina contabilizada en las 7 fincas fue de 622 animales 466 hembras (74,9%) y 156 machos (25,1%). Fueron examinados e incluidos en el estudio 72 bovinos, 71 (98,6%) hembras y 1 (1,4%) macho. De acuerdo a la edad 10 (13,9%) fueron ubicados en el grupo etario de 13 a 24 meses y 62 (86,1%) en el grupo etario mayor de 25 meses. Referente a la procedencia del ganado muestreado, 17 (23,6%) eran propios de la región (autóctonos) y 55 (76,4%) provenían de otras localidades (tabla 4).

Tabla 4. Procedencia de los bovinos incluidos en el estudio

Estado	Sector	Totales
Mérida	El Vigía	17 (23,6%)
Mérida	Chiguará	2 (4,2%)
Táchira	La Tendida	6 (10,2%)
Trujillo	Sabana de Mendoza	7 (12,2%)
Zulia	Sierra de Perijá	40 (73,4%)
Total		72

La evaluación clínica de los bovinos arrojó como resultado que 67 animales (93,1%) no mostraron signos compatibles con los reportados para la tripanosomiasis bovina causada por *T. vivax*, mientras que en 5 bovinos (6,9%) se evidenció alguna patología (tabla 5).

Tabla 5. Patologías observadas en los bovinos estudiados

Patología	Total
Anemia	1
Emaciación + caquexia	1
Enflaquecimiento	2
Fiebre + problemas de locomoción	1

3.3. Diagnóstico de las infecciones por *T. vivax* empleando el examen parasitológico directo

La valoración parasitológica de los 72 bovinos reveló presencia de flagelados en 4 de ellos, representando un 5,6% de prevalencia parasitaria a *Trypanosoma sp.* Los bovinos positivos pertenecían a un mismo rebaño ubicado en la parroquia H. A. Mora, hembras pertenecientes al grupo etario mayores de 25 meses y

procedentes de la región de Perijá del Estado Zulia con 4 meses de permanencia en la zona. Detalles sobre estos bovinos y sus características clínicas son mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Características de los bovinos positivos a *Trypanosoma sp*

Bovino positivo (N°)	Edad (meses)	Raza	Condición general
51	36	Cebuina	Regular Mucosas anémicas
52	36	Holtein	Buena
55	48	Criolla	Buena
60	60	Criolla	Buena

La detección de tripanosomas varió según la técnica empleada (tabla 7). El agente etiológico fue identificado como *T. vivax* según criterios morfológicos y biométricos entre los que se citan longitud media de 20-27 μm , porción posterior más ancha y bulbosa, kinetoplasto grande, terminal, flagelo libre corto (3-6 μm) y escaso desarrollo de la membrana ondulante (Hoare, 1972) en las muestras de los bovinos identificados con los números 51 y 55, representado 2,7% de prevalencia parasitológica por *T. vivax* en la zona estudiada (figura 9)

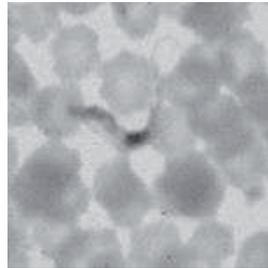
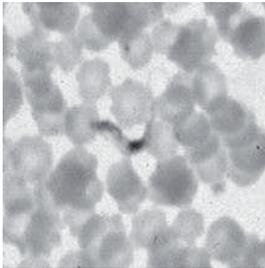
Tabla 7. Detección de infecciones por *Trypanosoma sp.*
 Diagnóstico parasitológico directo

Bovino positivo (Nº)	Microcentrifugación	Examen al fresco	Frotis sanguíneo
51	-	-	+
52	-	+(¹)	+
55	+	+(¹)	+
60	+	-	-

(¹) parasitemia Pizzi (1957) modificado por Brener (1961):

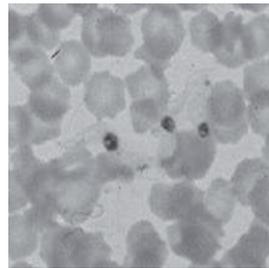
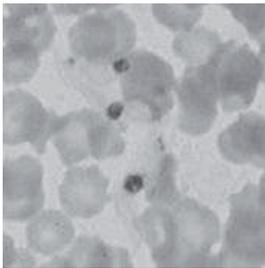
51: $6,7 \times 10^3$ tripanosomas/ml, 55: $8,0 \times 10^5$ tripanosomas/ml

FIGURA 9. *T. vivax* EN SANGRE DE BOVINOS INFECTADOS NATURALMENTE



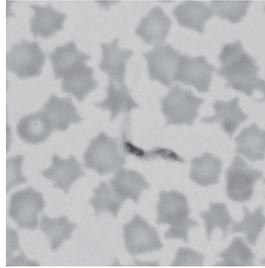
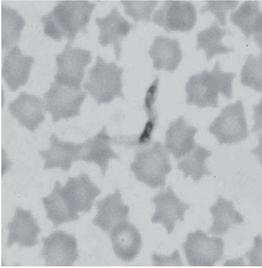
T. vivax. Formas alargadas. Frotis sanguíneo, coloración de Giemsa (100X)

Muestra bovino 51



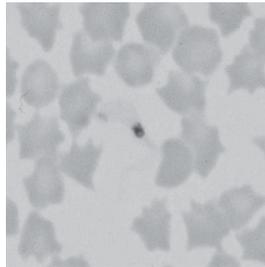
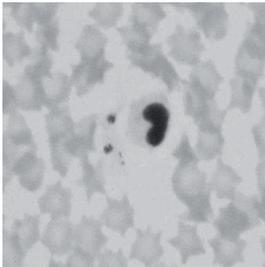
T. vivax. Formas en división. Frotis sanguíneo, coloración de Giemsa (100X)

FIGURA 9. (continuación) *T. vivax* EN SANGRE DE BOVINOS
INFECTADOS NATURALMENTE



T. vivax. Formas alargadas. Frotis sanguíneo, coloración de Giemsa
(100X)

Muestra bovino 55



T. vivax. Formas en proceso de división. Frotis sanguíneo, coloración de
Giemsa (100X)

3.4. Diagnóstico de las infecciones por *T. vivax* empleando la herramienta molecular

Haciendo uso de esta herramienta fueron detectados 2 bovinos positivos (2,7%) (figura 10) del total de los 72 bovinos muestreados correspondiendo a los mismos animales positivos a *T. vivax* por las técnicas parasitológicas, con lo cual se corrobora la infección por este parásito.

FIGURA 10. PCR PARA MUESTRAS SANGUÍNEAS DE BOVINOS PROVENIENTES DE ZONA GANADERA ENDÉMICA PARA *T. vivax*



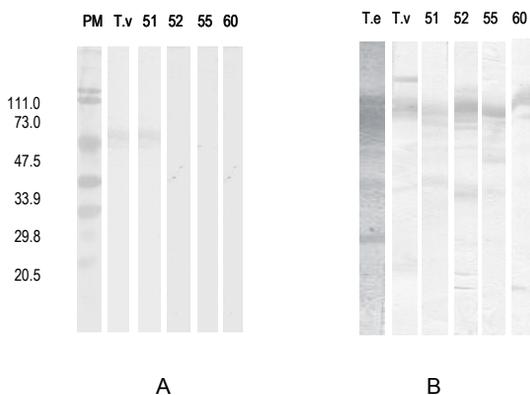
H₂O: control de reacción; C: ADN genómico *T. vivax*; 51 y 55: muestras problemas positivas a *T. vivax*; 71-74: muestras problemas negativas a *T. vivax*

3.5. Diagnóstico de las infecciones por *T. vivax* empleando la herramienta bioquímica

Las muestras sanguíneas de los bovinos positivos parasitológicamente a *T. vivax* (51 y 55) fueron analizadas por Western blot empleando las proteínas de membrana no solubilizadas por Tritón X-114 obteniendo señal solo para la muestra 51 (banda de 54 kDa). Fueron realizadas pruebas de antigenicidad para las muestras 51, 52, 55 y 60 empleando las proteínas citoplasmáticas de *T. evansi*, revelando señal para estas muestras (figura 11), la respuesta antigénica

generada no se correspondió a la misma evidenciada cuando estas proteínas fueron confrontadas con suero control de bovino positivo a *T. vivax*.

FIGURA 11. WESTERN BLOT EN MUESTRAS DE BOVINOS POSITIVOS A *Trypanosoma sp*



A: Western blot desarrollado con proteínas de la fracción F1 de *T. vivax*

B: Western blot desarrollado con proteínas de la fracción F1 de *T. evansi*

3.6. Determinación de parámetros hemáticos

3.6.1. Determinación de parámetros hemáticos en el total de bovinos muestreados

Para el total de la población bovina estudiada, los análisis hemáticos revelaron rangos de hemoglobina (Hb) entre 5,4 - 12,6 g/dl y 17 - 46% de hematócrito (Hto). Las cuentas globulares presentaron rangos entre 2,52 - 7,10 $\times 10^6$ eritrocitos/ μ l; 4,12 - 14,40 $\times 10^3$ leucocitos/ μ l y 1,30 - 3,28 $\times 10^5$ plaquetas/ μ l. Los valores promedios y de referencia de estos parámetros y el recuento diferencial son señalados en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Parámetros hemáticos en bovinos estudiados.
Comparación con los valores de referencia

Parámetro	Valor medio en bovinos estudiados	Valor de referencia ^(*)
Hb (g/dl)	9,0	8 - 15
Hto (%)	31,5	24 - 46
Eritrocitos (x10 ⁶ /μl)	4,81	5 - 10
Leucocitos (x10 ³ /μl)	9,26	4 - 12
Plaquetas (x10 ⁵ /μl)	2,29	1 - 8

(*) El Manual Merck de Veterinaria (1993)

Tabla 9. Parámetros leucocitarios en bovinos estudiados.
Comparación con los valores de referencia

Parámetro	Valor medio en bovinos estudiados	Valor de Referencia ^(*)
Linfocitos (%)	89	45 - 75
SN (%)	35	15 - 45
SE (%)	10	2 - 20
M (%)	2	2 - 7

(*) El Manual Merck de Veterinaria (1993)

SN: segmentados neutrófilos; SE: segmentados eosinófilos; M: monocitos

3.6.2. Determinación de parámetros hemáticos en bovinos positivos a *T. vivax*

El análisis hematológico de los bovinos positivos a *T. vivax* reveló alteraciones en la serie eritrocítica para el bovino N° 55 (tabla 10) resultando también alterada la descripción de frotis para el mismo bovino hallando un cuadro de anisocitosis con

moderados microcitos y una poiquilocitosis acentuada con abundantes equinocitos (células crenadas).

Tabla 10. Cuadro hematológico para bovinos positivos a *T. vivax*

Parámetro	Bovino N° 51	Bovino N° 55	Valores de referencia
Hb (g/dl)	8,10	6,80	8-15
Hto (%)	28,0	21,0	24-46
Eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	5,07	4,56	5-10
Leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	6,84	9,04	4-12
Plaquetas ($\times 10^9/\mu\text{l}$)	1,48	1,98	1-8
Recuento diferencial	60 SN 34 L 5 SE 1 M	22 SN 65 L 13 SE	45-75 L; 15-45 SN; 2-20 SE; 2 M

3.7. Determinación de parámetros químicos en bovinos positivos a *T. vivax*

La valoración de los analitos séricos a que fueron sometidos los sueros de los bovinos positivos a *T. vivax* refleja alteraciones de la creatinina, TGO, albúmina y globulinas para el bovino número 55. La muestra del bovino 51 solo presentó alteración de la TGO (tabla 11).

Tabla 11. Determinación de analitos séricos
para bovinos positivos a *T. vivax*

Analito sérico	Bovino N° 51	Bovino N° 55	Valor de referencia ^(*)
Glicemia (mg/dl)	61,5	53,8	42,1 - 74,5
Creatinina (mg/dl)	0,85	2,0	0,6 - 1,8
TGP (U/ml)	26,0	32,0	6,9 - 35,3
TGO (U/ml)	19,0	16,0	45,3 - 110,2
Proteínas totales (g/dl)	8,0	7,3	6 - 8
Albúmina (g/dl)	2,8	1,9	2,7 - 3,7
Globulinas (g/dl)	5,2	5,4	3,3 - 4,3

(*)El Manual Merck de Veterinaria (1993)

DISCUSIÓN

En el presente estudio fue desarrollada y ejecutada una metodología basada en el fraccionamiento proteico y la detección antigénica de las formas sanguíneas de *T. vivax*, la cual permitió la visualización de proteínas inmunogénicas de valor diagnóstico potencial. En este contexto, las bandas antigénicas detectadas fueron obtenidas a partir de muestras de proteínas citoplasmáticas y de la fracción de membrana no solubilizada cuando se utiliza el método Tritón X-114. Las bandas antigénicas reveladas de 31,5 y 66 kDa para la fracción citoplasmática, y de 20 y 54 kDa para la fracción de membrana no solubilizada por Tritón X-114, pudieran ser utilizadas como marcadores específicos confiables para el diagnóstico serológico de infecciones por *T. vivax*, dada la ausencia de reactividad con otros patógenos propios de ganado bovino que generalmente dan reacciones cruzadas causando interferencia diagnóstica con la tripanosomiasis vivax. Hasta cuanto hemos revisado en la bibliografía, no existe hasta el presente antecedentes sobre el hallazgo de bandas antigénicas similares a las detectadas en esta investigación, siendo escasos los estudios realizados sobre la caracterización proteica de *T. vivax* y su utilidad diagnóstica. En este sentido, Burleigh y col. (1993) hallan una proteína inmunogénica de 65 kDa para un aislado africano de *T. vivax* confinada a la superficie del parásito. Sin embargo, la misma no fue enfrentada con sueros de otros patógenos para verificar su especificidad. Masake y col. (1994) detectan una proteína inmunogénica específica para *T. vivax* de 8 kDa al confrontarla con un anticuerpo monoclonal del mismo parásito desarrollado en ratón no revelando reacción cruzada con suero de animales positivos a *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma brucei*. Los mismos autores (1995) detectan una proteína específica de *T. vivax* de 10 kDa distribuida alrededor del núcleo y citoplasma en todos los estados evolutivos del parásito a excepción de los epimastigotes, comprobando su especificidad al no reaccionar con anticuerpos de *T. congolense*, *T. brucei* o *Babesia sp.* Las diferencias de estas investigaciones con nuestros hallazgos quizás sea debida al aislado del parásito utilizado o a las diferencias en las técnicas de fraccionamiento empleadas.

La similitud antigénica detectada entre *T. vivax* y *T. evansi* ha permitido a algunos investigadores proponer el empleo de antígenos de *T. evansi* como herramienta diagnóstica para detectar infecciones por *T. vivax* en bovinos. En este sentido Uzcanga y col. (2002) detectan una proteína de membrana de 64 kDa a partir de un aislado venezolano de *T. evansi* de utilidad diagnóstica al reconocer sueros de equinos y bovinos infectados con *T. evansi* y *T. vivax*. Esto a nuestro entender ha sido la primera proteína inmunogénica aislada y parcialmente caracterizada de *T. evansi* con reactividad cruzada entre las dos especies de *Trypanosoma*. Los anticuerpos contra la p64 fueron capaces de reconocer una proteína antigénica de 53 kDa para un extracto de *T. vivax*. Asimismo, Uzcanga y col. (2004) confirman que esta p64 corresponde a una glicoproteína de superficie tipo VSG con epitopes comunes en *T. vivax* que permiten el reconocimiento de sueros de animales infectados con este parásito sugiriendo por tal razón, que la p53 de *T. vivax* pudiera ser igualmente una glicoproteína tipo VSG. Camargo y col. (2004) continuando con el aislamiento y caracterización de antígenos de *T. evansi* con utilidad diagnóstica hallan en la fracción citoplasmática de este *Trypanosoma* dos proteínas inmunogénicas de 51 y 68 kDa también con reactividad cruzada al reconocer sueros de animales positivos a *T. evansi* y *T. vivax* pero fallando en el reconocimiento de los anticuerpos producidos contra la p64 descrita con anterioridad. Los resultados arriba indicados aunque interesantes desde el punto de vista diagnóstico, no resuelven sin embargo el problema de la especificidad diagnóstica a la hora de diferenciar infecciones causadas por *T. vivax* o *T. evansi*. En contraste, los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten afirmar que a pesar de la similitud existente entre ambas especies de *Trypanosoma*, existen diferencias notables en cuanto al patrón proteico detectado y a la inmunogenicidad de las bandas detectadas, notándose la ausencia de reactividad cruzada entre las proteínas citoplasmáticas de *T. vivax* y *T. evansi* pudiendo establecerse de esta manera, un método diagnóstico diferencial altamente específico entre ambos hemoflagelados. Esta afirmación se hace tomando en consideración los resultados obtenidos cuando los antígenos de *T. vivax* representados por las proteínas citoplasmáticas fueron enfrentados a suero de animales infectados con *T. vivax*

y/o *T. evansi*. En este caso se observó una reactividad notoria, expresada como bandas bien diferenciadas de 31,5 y 66 kDa cuando el antígeno de *T. vivax* se enfrentó a suero de animales previamente infectados con el mismo parásito. Este resultado sugiere que existe especificidad del antígeno por el anticuerpo expresado como respuesta a la infección. Por otra parte, cuando se enfrenta los antígenos citoplasmáticos de *T. vivax* con el suero de animales infectados con *T. evansi* no se observó reactividad alguna, indicando que los anticuerpos anti-*T. evansi* no fueron capaces de reconocer los antígenos de *T. vivax*. Esta situación debe ser una advertencia para quienes realizan pruebas serológicas compartiendo antígenos de uno u otro *Trypanosoma*. Dicha situación fue señalada por Toro y col. (1980) quienes manifiestan preocupación por el empleo de antígenos de *T. evansi* para detectar infecciones por *T. vivax*, ya que en zonas ganaderas donde la tripanosomiasis equina es endémica, algunas de las reacciones positivas a *T. vivax* en bovinos, pudieran ser atribuidas a la presencia de *T. evansi* en los mismos.

La utilización de la técnica de PCR fue propuesta para establecer un diagnóstico integral de las infecciones producidas por *T. vivax* en el ganado bovino junto a la herramienta bioquímica y el empleo de técnicas parasitológicas, hematológicas y valoración de analitos séricos. Haciendo uso de este perfil diagnóstico fue posible detectar 2,7% de infección por *T. vivax* en fincas ganaderas del Estado Mérida, enfatizando la importancia de no emplear metodologías aisladas para el diagnóstico de este parásito evitando la emisión de resultados erróneos. Dicha situación se plantea por los resultados encontrados con el diagnóstico parasitológico ya que fueron detectados 4/72 (5,6%) bovinos positivos a *Trypanosoma sp* corroborando con la prueba del PCR 2,7% (2/72) de infección por *T. vivax*. La sangre de los bovinos positivos por microscopía fue cultivada en medio NNN hallando solo 2 animales positivos, situación que pudiera explicarse dado que la especie desarrollada pudo haber correspondido a otra especie de *Trypanosoma* que como *T. theileri* puede ser identificada bajo la forma de epimastigotes característicos de la especie (datos no incluidos). La razón de esta

aseveración radica en el hecho de que ambos tripanosomas comparten los mismos hospederos vertebrados e invertebrados además de la misma distribución geográfica, y como es señalado por Hoare (1972), Shaw y Lainson (1972) y Duno (1992) el diagnóstico diferencial se hace en base a la capacidad de *T. theileri* de desarrollarse in vitro. Otro aspecto digno de mención es el encuentro de uno de los bovinos estudiados identificado N° 60, positivo por parasitología y negativo por PCR y cultivo, quizás pudiera explicarse el hecho por la pérdida o degradación de ADN. Este resultado corrobora otros similares como Morlais y col. (2001) quienes atribuyen una falta de correlación entre las técnicas parasitológicas y moleculares en el diagnóstico de infecciones por *T. vivax* a las bajas parasitemias con lo que la concentración del ADN se hace insuficiente para revelar un producto en geles de agarosa.

En el diagnóstico parasitológico resulta importante no limitarse a una sola técnica debido a las diferencias halladas con el empleo del examen al fresco, microcentrifugación y frotis. Situación similar fue encontrada por Toro y col. (1979) quienes revelan diferencias significativas entre la microcentrifugación, gota gruesa y el frotis. Sin embargo, Morón (2001) no encuentra diferencias en la eficacia diagnóstica de estas técnicas.

Debido a la mayor sensibilidad de los métodos moleculares sobre los métodos parasitológicos y serológicos cada día cobran mayor importancia en el diagnóstico de campo de *T. vivax* sobre todo en tierras africanas siendo escasos hasta el presente los reportes citados en tierras americanas según lo señalado por Gonzales y col. (2003) y Dávila y col. (2003). De este modo, Masake y col. (1997) detectan mayor sensibilidad con la PCR que con la microscopía o la serología, siendo capaz de identificar en animales infectados experimentalmente ADN a partir del 5 día post-infección; Desquesnes (1997), por su parte, detecta ADN aun en animales tratados y Desquesnes y Tresse (1996) manifiestan que en la detección de infecciones por *T. vivax* utilizando PCR, la muestra de buffy coat es más sensible que la sangre total, plasma y lisado de eritrocitos debido a que

puede detectar ADN circulante en bovinos cuando la carga parasitaria está por debajo de $4,0 \times 10^2$ parasitos/ml.

Los resultados en las muestras positivas a *Trypanosoma sp* haciendo uso de la herramienta bioquímica con las proteínas de membrana no solubilizadas por Tritón X-114 de *T. vivax* comprueban la especificidad de la reacción al no detectar señal en muestras negativas a este parásito. Para las muestras positivas a *T. vivax* solo se detectó reacción en un bovino pudiendo explicar la ausencia de reactividad en el otro animal por falta de respuesta humoral quizás debida al hecho de que el parásito aun no había desencadenado un estímulo antigénico en este hospedador. Tal aseveración corrobora lo establecido por Uzcanga y col. (2004) al señalar que la respuesta inmunológica detectada por el Western blot es más evidente cuando la infección avanza en el tiempo. Estos hallazgos enfatizan la importancia de utilizar un diagnóstico integral para detectar infecciones por *T. vivax*. Camargo y col. (2004) por su parte sostienen que la negatividad en Western blot para muestras que han resultado positivas por otros métodos principalmente los serológicos quizás sea debida al hecho de que un solo antígeno resulta insuficiente para propósitos diagnósticos debido a las diferencias de expresión antigénica entre los diferentes aislados parasitarios o a las variaciones inmunogénicas entre los hospederos, cruciales para determinar el reconocimiento antigénico.

Es importante mencionar la inespecificidad del Western blot para detectar infección por *T. vivax* en muestras de bovinos recolectadas bajo condiciones de campo utilizando las proteínas de membrana no solubilizadas por Tritón X-114 de *T. evansi*. En este particular, las proteínas antigénicas de este parásito detectaron señal aun en los bovinos negativos a *T. vivax*.

Es bien conocido que el diagnóstico clínico no es un parámetro concluyente para detectar infecciones por *T. vivax* a sabiendas de la ausencia de signos patognomónicos característicos y la presencia de animales infectados sin clínica

(Silva y col, 1996; Ventura y col, 2001). De este modo, la ausencia de sintomatología en uno de los bovinos positivos detectados en este estudio enfatiza el importante papel que como reservorio juega en la ganadería de la región, situación señalada con anterioridad (Gardiner, 1989; Rivera, 1996, Dávila y col, 2003), pudiendo contribuir además, en calidad de oportunista tal como señala Paiva y col (1998) citado por Schenk y col. (2001), quienes establecen que en algunas fincas los bovinos infectados con *T. vivax* contribuyen en calidad de oportunistas por los movimientos frecuentes de los animales, períodos prolongados de restricción alimentaria e inadecuadas prácticas de manejo del rebaño. Según lo expresado por los conocedores de la zona estudiada, dichas situaciones son frecuentes lo que pudiera reflejarse en una elevada incidencia por este parásito, pero el tratamiento preventivo o paliativo a que son sometidos los animales pudiera dificultar la detección de infecciones activas enmascarando la real distribución de la enfermedad.

La alteración en el perfil hematológico de uno de los bovinos positivos a *T. vivax* pudiera ser indicio del daño insipiente causado por el parásito. Tal situación ha sido reportada por varios autores. En este sentido, Sandoval y col. (1996), Silva y col. (1999) y Espinoza y col. (2000) detectan disminución en la cuenta leucocitaria en bovinos infectados experimentalmente durante la primera semana post-infección coincidente con el primer pico de parasitemia. Estos valores tienden a aumentar en el tiempo pero sin llegar a alcanzar el valor obtenido en semanas previas a la infección. Referente a los cambios en los valores plaquetarios Sandoval y col. (1996) hallan un comportamiento similar al reportado para los leucocitos. Por su parte, las alteraciones en la línea celular roja ha sido mayormente estudiada tal como lo demuestran los hallazgos de Sandoval y col. (1995) quienes observan disminución en los valores de hemoglobina, hematocrito y contaje eritrocitario concordantes a la detección de *T. vivax* en un modelo ovino infiriendo el origen de estos descensos en una anemia de tipo hemolítico y parcialmente intravascular al inicio de la parasitosis, cobrando tendencia microcítica-hipocrómica en etapa crónica. Espinoza y col. (1996) reportan una

anemia normocítica-normocrómica en bovinos Holstein y hacia la etapa crónica anisocitosis, poiquilocitosis e inclusiones intraeritrocitarias. Silva y col. (1999) estudiando infecciones naturales en bovinos de la región del Pantanal (Brasil) y zonas bajas de Bolivia encuentran una anemia de tipo macrocítica-hipocrómica con la presencia de policromasia e inclusiones intraeritrocitarias.

Es notoria la atención hacia los valores promedios en el análisis hematológico para los bovinos no infectados por *T. vivax*. Dichos valores fluctúan cerca o por debajo de los rangos de referencia, situación que pudiera predisponer a los animales a un fácil riesgo de infección por un compromiso nutricional e inmunológico en que se pudieran encontrar.

Los hallazgos en la valoración sérica revelan disminución de la transaminasa oxaloacética (TGO) para los dos bovinos infectados con *T. vivax* y aumento de la creatinina para uno de ellos indicativos de daño insipiente a nivel de hígado y riñón producto de la acción parasitaria. Tal situación también fue expresada por Kadima y col. (2000) quienes infectan experimentalmente cuatro bovinos con un aislado africano de *T. vivax* observando luego del primer pico de parasitemia disminución en los valores de TGO y urea constantes hasta el décimo tercer día post-infección atribuyendo las variaciones a un posible daño celular u orgánico producto de la acción parasitaria. Por su parte Espinoza y Primera (2002), valoraron TGO y TGP en cabras infectadas con un aislado venezolano de *T. vivax* encontrando alteraciones en los valores de TGP posiblemente atribuibles al daño insipiente en músculo cardíaco y tejido hepático resultando extraño el comportamiento de la TGO que no varió a sabiendas que las células rojas son afectadas por la acción parasitaria y contienen gran cantidad de esta enzima.

Dentro de la evaluación sérica, también fueron halladas alteraciones en la relación albúmina/globulina en uno de los bovinos positivos a *T. vivax* que pudiera explicarse por un proceso de hemodilución reflejado por el cuadro anémico y/o al hecho de que el animal ha empezado a desarrollar respuesta humoral. Situación

similar fue observada por Sandoval y col. (1995) quienes encuentran que la disminución de los niveles de albúmina y elevación de las gammaglobulinas corresponden a la respuesta del hospedador. Por su parte Schenk y col. (2001) observan en bovinos infectados una disminución significativa en los valores de la albúmina entre el cuarto y octavo día post-infección y un aumento significativo de los valores de la gammaglobulina a partir del décimo segundo día post-inoculación relacionándolos a un estímulo antigénico desencadenado por el parásito.

En conclusión, haciendo uso de la metodología descrita, pudimos desarrollar en el presente trabajo, una herramienta bioquímica específica para la detección de las infecciones producidas por *T. vivax* en bovinos en virtud de la gran importancia que reviste la infección por este agente representada principalmente por las pérdidas económicas que ocasiona al rebaño bovino nacional y que se hace extensible también, a los pequeños rumiantes.

Aunque la distribución de la tripanosomiasis vivax es ampliamente conocida resulta difícil ser diagnosticada en su apropiada dimensión, es por ello que el aporte realizado en esta investigación pretende enriquecer la información que en materia diagnóstica existe en el país.

CONCLUSIONES

La detección de bandas antigénicas de 20, 31,5, 54 y 66 kDa presentes en las formas sanguíneas de *T. vivax*, permiten su utilización como antígenos especie-específicos de valor diagnóstico al diferenciar entre infecciones producidas por *T. vivax* y patógenos propios del ganado bovino causales de interferencia diagnóstica.

Anticuerpos anti-*T. evansi* no fueron revelados al emplear antígenos de *T. vivax*, comprobando la ausencia de reactividad cruzada entre estas especies de *Trypanosoma*, estableciendo la utilización de proteínas citoplasmáticas como potenciales antígenos diferenciales

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) demostró ser altamente confiable para la detección del ADN parasitario de *T. vivax* resultando mejor la utilización de buffy coat en el procesamiento de las muestras sanguíneas recolectadas bajo condiciones de campo.

En el diagnóstico de campo de *T. vivax* es necesario el empleo de un diagnóstico integral que permita establecer la especificidad de la infección y magnitud del daño producido por este hematozoario.

Los animales detectados positivos a *T. vivax* se ubicaron en una finca con tipo de explotación doble propósito con tendencia a la leche, provenientes del Estado Zulia (introducidos en la zona).

Se detectaron diferencias en el perfil clínico de los bovinos positivos a *T. vivax* manifestando la ausencia de signos patognomónicos.

El análisis de los parámetros hemáticos y químicos en los bovinos positivos a *T. vivax* ayudan a evaluar el daño producido en órganos y tejidos y estiman la evolución del animal.

RECOMENDACIONES

Emplear en el diagnóstico de infecciones producidas por *T. vivax* antígenos especie-específicos para evitar la emisión de resultados erróneos que pudieran enmascarar la real prevalencia de las infecciones producidas por este agente.

Continuar con las investigaciones en el campo del asilamiento y purificación de *T. vivax* que permitan obtener un mejor rendimiento parasitario, facilitando su empleo en el desarrollo de las pruebas bioquímicas (Western blot).

No limitarse a la utilización de los métodos parasitológicos en el diagnóstico de campo debido a la presencia de otros hemoflagelados que pudieran ser causales de resultados falsos.

Proseguir con las investigaciones en la zona para detectar la real distribución de las infecciones por *T. vivax* considerando las variaciones estacionales, la continua movilización de ganado y el estado sanitario de los animales que pudieran predisponer a un mayor riesgo de infección.

Incluir en el diagnóstico de campo el estudio de la población de vectores que permita detectar el principal transmisor en la zona.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANOSA, V. 1983. Diseases produced by *Trypanosoma vivax* in ruminants, horses and rodents. Zentralblatt fuer veterinaermedizin. 30: 717-741.
- BRENER, Z. 1961. Contribucao ao estudo de terapeutica experimental de doenca de Chagas. Belo Horizonte Instituto Nacional de Endemias Rurais. Mimeo. 79 pag.
- BURLEIGH B.; WELLS C.; CLARKE M.; GARDINER P. 1993. An integral membrane glycoprotein associated with an endocytic compartment of *Trypanosoma vivax*: identification and partial characterization. J Cell Biol. 120(2): 339-352.
- CAMARGO, R.; UZCANGA, G.; BUBIS, J. 2004. Isolation of two antigens from *Trypanosoma evansi* that are partially responsible for its cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. Vet Parasitol. 123: 67-81.
- CLARKSON, M.; McCABE, W.; COLINA, H. 1971. Bovine tripanosomiasis in Venezuela. Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg. 65(2): 257-258.
- CORDOVES, C.; FERNANDEZ, C.; GARCIA, A.; GONZALEZ, B. 1982. *Trypanosoma vivax* Ziemann, 1905, lista de transmisores mecánicos en Cuba. Rev Cub Cienc Vet. 13: 219-222.
- DAR, F.; PARIS, J.; WILSON, J. 1973. Haematological and serum protein changes caused by *Trypanosoma vivax* infections in East African Zebu cattle. Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg. 67(2): 287.
- DAVILA, A.; HERRERA, H.; SCHLEBINGER, T.; SOUZA, S.; TRAUB-CSEKO, Y. 2003. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomiasis in the Pantanal, Brasil. Vet Parasitol. 177(1-2): 1-13.
- DAVIS, C. 1982. Thrombocytopenia: a uniform complication of African trypanosomiasis. Acta Tropica. 39: 123-133.
- De ALMEIDA, P.; NDAO, M.; VAN MEIRVENNE, N.; GEERTS, S. 1997. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Acta Tropica. 66: 45-50.
- DESQUESNES, M.; TRESSE, L. 1996. Evaluation of sensitivity of PCR for detecting DNA of *Trypanosoma vivax* with several methods of blood sample preparations. Rev Elev Med Vet Pays Trop. 49(4): 322-327.

DESQUESNES, M. 1997. Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immuno sorbent assay. *Acta Tropica*. 65: 139-148.

DESQUESNES, M.; Mc LAUGHLIN, G.; ZOUNGRANA, A.; DAVILA, A. 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol* 31(5-6): 610-614.

DIAZ-UNGRIA, C.; MALDONADO, C. 1972. Contribución al diagnóstico de la tripanosomiasis. *Cs. Vets. LUZ-FCV*. 2 (1-4): 21-41.

DIRIE, M.; OTTE, M.; THATTHI, R.; GARDINER, P. 1993. Comparative studies of *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* isolates from Colombia. *Parasitology*. 106: 21-29.

DUNO, F. 1992. Prevalencia de la tripanosomiasis bovina en la región nor-oriental del estado Falcón. Trabajo de grado. MSc. UCV-FCV. Mimeo. 148 pag.

DUVALLET, G.; de la ROCQUE, S.; REIFENDERG, J.; SOLANO, P.; LEFRANCOIS, T.; MICHEL, J.; BENGALY, Z.; SIDIBE, I.; CUISANCE, D.; CUNY, G. 1999. Review on the molecular tools for the understanding of the epidemiology of animal trypanosomiasis West Africa. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 94(2): 245-248.

EL MANUAL MERCK DE VETERINARIA. 1993. Cuarta Edición en Español. Merck. Barcelona. 2092 pag.

ESPINOZA, E.; ASO, P.; GONZALEZ, N.; RANGEL, L. 1996. Clasificación morfológica de la anemia desarrollada en bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Veterinaria Trop*. 21(2): 201-214.

ESPINOZA, E.; GONZALEZ, N.; ASO, P.; PERRONE, T. 1999 a. Incidencia serológica de *Trypanosoma vivax* en becerros a pastoreo en sabanas del estado Guárico. *Veterinaria Trop*. 24(1): 5-15.

ESPINOZA, E.; GONZALEZ, E.; PERRONE, T.; ASO, P.; HIDALGO, L.; BARAZARTE, L. 1999 b. Aplicación del ensayo inmunoenzimático (ELISA-Ac/T. *evansi*) para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma vivax* en el estado Bolívar. *Veterinaria Trop*. 24(1): 47-53.

ESPINOZA, E.; GONZALEZ, N.; ASO, P.; CABALLERO, H.; FUENMAYOR, J.; HIDALGO, L. 2000. Leucograma en novillas y becerros (holstein) infectados con una cepa venezolana de *Trypanosoma vivax*. *Pesq. Agropec. Bras*. 35(3): 647-652.

ESPINOZA, E.; PRIMERA, G. 2002. Valores de transaminasas en cabras criollas infectadas con *Trypanosoma vivax*. *Pesq. Agropec. Bras*. 37(1): 103-107.

FAISSON, R.; MAYER, M.; PIFANO, F. 1948. El ciervo (*Odocoileus gymnootis*) portador del *Trypanosoma vivax* en Venezuela. Rev. Gracol. Zootec. Hig. Med. Vet. 2:944-946.

FOIL, L. 1989. Tabanids as vector of disease agents. Parasitology Today. 5: 88-96.

GARCIA, F. 1997. Efecto de la tripanosomiasis sobre la reproducción en rumiantes. En: Taller sobre agentes hemotrópicos: tripanosomiasis, babesiosis y anaplasmosis. Memorias. ASODEGAA. El Vigía. Mérida, Venezuela. 93 pag.

GARDINER, P. 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. Adv. Parasitol. 28: 229-317.

GONZALES, J.; JONES, T.; PICOZZI, K.; CUELLAR, H. 2003. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of bovine trypanosomiasis and epidemiological surveillance in Bolivia. Kinetoplastid Biology and Disease. 2(8).

GONZALEZ, L.; GARCIA, J.; NÚÑEZ, C.; PERRONE, T.; GONZALEZ, B.; GONZATTI, M.; REYNA, A. 2002. Un método novedoso de purificación de *Trypanosoma vivax* a partir de sangre de un ovino infectado experimentalmente. Acta Cient. Venezolana. 53 (Supl. 1): 213.

GONZALEZ, N.; ESPINOZA, E. 1994. Transmisión transplacentaria del *Trypanosoma vivax* y su efecto sobre la descendencia de hembras gestantes infectadas experimentalmente. Veterinaria Trop. 19(1): 41-53.

GUILLEN, A.; LEON, E.; ARAGOT, W.; SILVA, M. 2001. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias Período 1986-2000. Veterinaria Trop. 26(1): 47-62.

HOARE, C. 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 401-429 pag.

HULL, R. 1973. The cyclical transmission of a West African strain of *Trypanosoma vivax* to rabbits by *Glossina morsitans*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg. 67(2): 289.

JONES, T.; DAVILA, A. 2001. *Trypanosoma vivax*-out of Africa. Trends in Parasitology. 17(2): 99-101.

KADIMA, K.; GYANG, E.; SAROR, D.; ESIEVO, K. 2000. Serum biochemical values of *Trypanosoma vivax* infected cattle and the effects of lactose in saline infusion. Veterinarski Archiv. 70(2): 67-74.

KO, Y.; THOMPSON, G. 1995. Purification of Glicosil-Phosfatidil-Inositol-Ancored proteins by modified Triton X-114 partitioning and preparative gel electroforesis. *Anal Biochem* 224: 166-172.

KUBES, V. 1944. El *Trypanosoma vivax* americano. Grofolit. Caracas. Venezuela. 126 pag.

LANHAM, S.; GODFREY, D. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*. 28: 521-534.

LAEMMLI, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.

LEGER, M.; VIENNE, M. 1919. Epizootie a trypanosomes chez les bovidés de la Guyane française. *Bull. Soc. Path. Exat.* 12: 258.

LUMSDEN, W.; KIMBER, C.; EVANS, D.; DOIG, J. 1979. *Trypanosoma brucei* miniature anion-exchange centryfugation techique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg.* 73(3): 312-317.

MARQUEZ, N. 1997. Tópicos prácticos generales sobre anaplasmosis bovina, pérdidas económicas, problemas reproductivos y tratamiento. En: Taller sobre agentes hemotrópicos: tripanosomiasis, babesiosis y anaplasmosis. Memorias. ASODEGAA. El Vigía, Mérida, Venezuela. 93 pag.

MASAKE, R.; NANTULYA, V.; PELLÈ, R.; MAKAU, J.; GATHUO, H.; ole-MOIYOI, K. 1994. A species-specific antigen of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* detectable in the course of infection is encoded by a differentially expressed tandemly reiterated gene. *Molecular and Biochemical Parasitology* 64: 207-218.

MASAKE, R.; ole-MOIYOI, K.; URAKAWA, T.; HIRUMI, H.; MAJIWA, P.; WELLS, C.; MINJA, S.; MAKAU, J.; NANTULYA, V. 1995. Immunological characterization and expression in *Escherichia coli* and Baculovirus systems of a *Trypanosoma vivax* antigen detected in the blood of infected animals. *Experimental Parasitology*. 81: 536-545.

MASAKE, R.; MAJIWA, P.; MOLOO, S.; MAKAU, J.; NJUGANA, J.; MAINA, M.; KABATA, J.; ole-MOIYOI, O.; NANTULYA, V. 1997. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology*. 85: 193-205.

MASIGA, D.; SMYTH, A.; BROMIDGE, T.; GIBSON, W. 1992. Sensitive detection of Trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. International Journal for Parasitology. 22(7): 909-918.

MAYAUDON, H. 1979. Las enfermedades parasitarias en los animales domésticos de Venezuela. Capitulo III. Bovinos. UCV-FCV. 45-51 pag.

McCABE, W.; CLARKSON, M. 1971. Tsetse transmission of *Trypanosoma vivax*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg. 65 (2): 259.

MELENDEZ, R.; JIMENEZ, S. 1979. Estudios sobre *Trypanosoma vivax* americano. Acta Cient. Venezolana. 30: 309-313.

MELENDEZ, R.; FORLANO, M.; FIGUEROA, W. 1993. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. J. Parasitol. 79(2): 293-294.

MORLAIS, I.; RAVEL, S.; GRÉBAUT, P.; DUMAS, V.; CUNY, G. 2001. New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. Acta Tropica. 80: 207-213.

MORON, L. 2001. Tripanosomiasis bovina en cinco municipios del noreste del Estado Trujillo. Trabajo de grado. MSc. ULA. NURR. Mimeo. 118 pag.

ÑANEZ, B.; BRETaña, A.; CONTRERAS-BRETaña, M.; GIARDINA, S. 2001. Infección múltiple de bovinos en el trópico. Un estudio de microscopía electrónica de barrido y transmisión. Acta Cient. Venezolana. 52(Supl. 3): 269-270.

OTTE, M.; ABUABARA, J. 1991. Transmission of South America *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. Acta Tropica. 49: 73-76.

PAIVA, F.; LEMOS, R.; NAKAZATO, L.; MORI, A.; BRUM, K.; BERNARDO, K. 1998. Acompanhamento clínico, laboratorial e anatomopatológico de rebanho infectado por *Trypanosoma vivax* no Pantanal Sul-Matogrossense. Relatório. UFMS, Campo Grande, MS. 10 pag.

PERRONE, T.; LESSEUR, C.; REVERON, I.; ESPINOZA, E.; ASO, P. 1991. Análisis seroepidemiológico de la tripanosomiasis bovina en la zona de Santa María de Ipire. Acta Cient. Venezolana. 42(Supl. 1): 208.

PIZZI, T. 1957. Inmunología de la enfermedad de Chagas. Universidad de Chile. Santiago. Mimeo. 183 pag.

RIVERA, M. 1996. Hemoparasitosis bovinas: tripanosomiasis. UCV. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. 15-84 pag.

RIVERA, M.; GARCIA, F. 2001. Tripanosomiasis bovina. Situación actual en Venezuela. Tratamiento y control. Cátedra de Parasitología. FCV-UCV. Mimeo. 10 pag.

RODRÍGUEZ-VIVAS, R.; QUIÑÓNEZ-AVILA, F.; RAMÍREZ-CRUZ, G.; RUIZ-PIÑA, H. 2003. Presencia del género *Trypanosoma* en la garrapata *Boophilus microplus* en el trópico mexicano. Rev. Biomed. 14: 29-33.

SANDOVAL, E.; ESPINOZA, E.; VALLE, A. 1995 a. Parasitemia y comportamiento clínico en ovejas infectadas experimentalmente. Veterinaria Trop. 20: 67-84.

SANDOVAL, E.; ESPINOZA, E.; VALLE, A. 1995 b. Variaciones hematológicas en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Revista Científica FCV-LUZ. 5(3): 147-159.

SANDOVAL, E.; ESPINOZA, E.; VALLE, A. 1996. Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Veterinaria Trop. 21(1):13-33.

SCHENK, M.; MENDONÇA, C.; MADRUGA, C. 2001. Avaliação clínico-laboratorial de bovinos Nelore infectados experimentalmente com *Trypanosoma vivax*. Pesqui. Vet. Bras. 21(4):157-161.

SEIDL, A.; DAVILA, A.; SILVA, R. 1999. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Low lands. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94(2): 269-272.

SHAW, J.; LAINSON, R. 1972. *Trypanosoma vivax* in Brasil. Ann. Trop. Med. Parasitol. 66(1): 25-32.

SILVA, R.; Da SILVA, J.; SCHNEIDER, R.; FREITAS, J.; MESQUITA, D.; MESQUITA, T.; RAMIREZ, L.; RIVERA, A.; BARBOSA, M. 1996. Outbreak of Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in Bovines of the Pantanal, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 91(5): 561-562.

SILVA, R.; EGUEZ, A.; MORALES, G.; EULERT, E.; MONTENEGRO, A.; IBÁÑEZ, R.; SEIDL, A.; MARTÍN, A.; DAVILA, R.; RAMÍREZ, L. 1998. Bovine tripanosomiasis in Bolivian and Brazilian lowlands. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93(1): 29-32.

SILVA, R.; RAMIREZ, L.; SOUZA, S.; ORTIZ, A.; PEREIRA, S.; DAVILA, A. 1999. Hematology of natural bovine trypanosomiasis in the Brazilian Pantanal and Bolivian wetlands. Veterinary Parasitology 85: 87-93.

TAMASOUKAS, R.; ROA N. 1996. Tripanosomiasis bovina (*T. vivax*): una revisión. Maracay. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 64 pag.

TAMASOUKAS, R.; RUIZ, H.; BALDIZAN, A.; GONZALEZ, A.; AGUIRRE, A. 1996. Seroprevalencia relativa general debida al *Trypanosoma vivax* en fincas de la región central de Venezuela. Acta Cient. Venezolana. 48(Sup.):71.

TEJERA, E. 1920. Trypanosomiasis animales en Venezuela. Bull. Soc. Path. Exot. 13: 297-305.

TORO, M.; LEON, E.; LOPEZ, R.; RUIZ, A.; GARCIA, J. 1979. La técnica de microcentrifugación en el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina. Acta Cient. Venezolana. 30: 502-506.

TORO, M.; LEÓN, E.; LÓPEZ, R.; GARCÍA, J.; RUIZ, A. 1980. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. Veterinaria Trop. 5: 43-50.

TORO, M.; LEON, M.; PALLOTA, F.; GARCIA, J.; RUIZ, A.; LAGO, M. 1985. Determinación de la prevalencia de las hemoparasitosis de Yaracal, Estado Falcón. Informe final. Instituto de Investigaciones Veterinarias. FONAIAP. 4 pag.

TORO, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. Memorias. Curso sobre técnicas de inmunodiagnóstico de enfermedades causadas por hemoparásitos. USB-FCV-UCV. Mimeo. 12 pag.

TORRELLAS, J. 1941. Observaciones sobre tripanosomiasis bovina. Varios casos de una forma nerviosa presentada en el estado Zulia. Rev. Med. Vet. y Parasitol. 3(4): 181-185.

UZCANGA, G.; MENDOZA, M.; ASO, P.; BUBIS, J. 2002. Purification of a 64Kda antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. Parasitology. 124(3): 287-299.

UZCANGA, G.; PERRONE, T.; NODA, J.; PEREZ-PAZOS, J.; MEDINA, R.; HOEBAKE, J.; BUBIS, J. 2004. Variant surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. Biochemistry. 43: 595-606.

VENTURA, R.; PAIVA, F.; SILVA, R.; TAKEDA, G.; BUCK, G.; TEIXEIRA, M. 2001. *Trypanosoma vivax* characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequense. Experimental Parasitology. 99(1): 37-48.

VOGELSANG, E.; GALLO, P. 1950. Protozoarios en animales domésticos observados en Venezuela. Rev. Med. Vet. Parast. 9(1-4): 133-135.

WILSON, A.; DAR, F.; PARIS, J. 1973. Some observations on a herd of cattle maintained under chemotherapeutic cover in a area of high tsetse fly challenge. Trans. Roy. Soc. Trop. Med and Hyg. 67(2): 287-288.

WINSTON, E.; FULLER, S.; HURRELL, J. 1987. Western blotting. Current rotocols in molecular biology (Edits. Ausubel F., Brent R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K.) (G.P.A and Wiley-Interscience, NY-EEUU.) Chap. 10.8.

ANEXO 1

CARACTERÍSTICAS DE LAS FINCAS

FECHA _____

FINCA _____ SUPERFICIE (ha) _____

PROPIETARIO _____

UBICACIÓN _____

MUNICIPIO _____

TIPO DE EXPLOTACIÓN: carne _____ leche _____ doble propósito _____

POBLACIÓN BOVINA ESTIMADA

	BECERROS	MAUTES	NOVILLOS	ADULTOS	TOTAL
HEMBRAS					
MACHOS					

RAZA (S) _____

SISTEMA (S) DE PRODUCCIÓN: intensiva _____ semi-intensiva _____

CONDICIÓN SANITARIA: buena _____ regular _____ mala _____

SEGUIMIENTO SANITARIO _____

ANTECEDENTES DE TRIPANOSOMIASIS BOVINA _____



MoreBooks!
publishing



yes i want morebooks!

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at

www.get-morebooks.com

¡Compre sus libros rápido y directo en internet, en una de las librerías en línea con mayor crecimiento en el mundo! Producción que protege el medio ambiente a través de las tecnologías de impresión bajo demanda.

Compre sus libros online en

www.morebooks.es



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de
www.vdm-vsg.de

