
EVALUACIÓN DE LA TRIPANOSOMOSIS CAUSADA POR *Trypanosoma vivax* EN BOVINOS DE LAGUNETA DE LA MONTAÑA, ESTADO MIRANDA

Ramírez José, Ibarra Victoria, Chacón Yaremis, Eleizalde Mariana,
Tavares Lucinda, Reyna Armando, López Yanina, Mendoza Marta
Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios - UNESR
mendozamarta17@gmail.com

Resumen

Trypanosoma vivax es un parásito hemoflagelado causante de la tripanosomosis bovina, la cual afecta principalmente a los rumiantes de las regiones tropicales, ocasionando una disminución en la productividad de los rebaños. Existen diferentes métodos para su diagnóstico, entre los cuales se destacan: métodos parasitológicos, como la técnica de concentración por microhematocrito (CMH), los inmunológicos como el ELISA indirecto (ELISAI) y los métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El objetivo en este trabajo fue evaluar la prevalencia de la tripanosomosis en una población de bovinos de Laguneta de la Montaña del Estado Miranda, mediante la detección de *T. vivax* por CMH, ELISA indirecto y la PCR. Para ello se tomaron 43 muestras de sangre de bovinos proveniente de 8 unidades de producción ganadera. Las muestras fueron analizadas parasitológicamente por la CMH resultado positivas 13,9%. A partir de los sueros se determinaron los anticuerpos reaccionantes anti tripanosoma resultando en 46,5% de animales seropositivos. Por último, se extrajo y cuantificó el ADN para evaluar la presencia de tripanosomas por PCR empleando los cebadores TWJ1/2, especie específicos, resultando positivos 48,8%. Este trabajo demuestra la superioridad de la PCR para establecer la prevalencia de la tripanosomosis causada por *T. vivax* en los bovinos de campo, donde generalmente los animales se encuentran en estado crónico y con parasitemias crípticas. Por otra parte, esta prevalencia de la tripanosomosis en un clima de montaña a más de 1300 metros de altura, refleja la importancia de esta enfermedad aún en la ganadería de altura.

Palabras clave: *Trypanosoma vivax*, tripanosomosis, diagnóstico, bovinos, Laguneta de la Montaña.

Introducción

Trypanosoma vivax es un parásito hemoflagelado de la familia trypanosomatidae, siendo sus hospedadores principales los rumiantes. La tripanosomiasis está ampliamente distribuida en las regiones tropicales del mundo, ocasionando una disminución en la productividad de los rebaños y por lo tanto constituye un obstáculo para el desarrollo de la ganadería en diversos países Desquesnes (2004).

En Venezuela, *T. vivax* fue reportado por primera vez en 1920 por Enrique Tejera, quien lo observó en bovinos y lo describió morfológica y biológicamente. Algunas investigaciones epidemiológicas han sido realizadas en el país, las cuales demuestran que la tripanosomosis bovina presenta una alta prevalencia en el territorio nacional. Un ejemplo, es el trabajo de Toro (1980), quien determinó una seroprevalencia promedio para *T. vivax* del 25.5 % (rango 17.2% a 39.3%), en bovinos de 10 estados del país, especialmente en las zonas ganaderas, afectando a animales de diferentes tipos de explotaciones, raza, edad y sexo. En una investigación reciente que contempló 49 explotaciones ganaderas distribuidas en 4 regiones geográficas: llanos (orientales y occidentales), sur del lago y centro-occidental, se observó una seroprevalencia de 33,1% (rango: 10% - 41,4%) demostrando la amplia diseminación de esta hemoparasitosis en el país [Suarez *et al.*, (2009)].

La tripanosomosis produce trastornos reproductivos como infertilidad y abortos, así como también retardo del crecimiento, pérdida de peso y

disminución de la condición corporal, que pueden desembocar en la muerte del animal. Todo esto origina grandes pérdidas económicas debido a la baja productividad de los rebaños por la disminución en la ganancia de peso y producción láctea, sumado a los costos en fármacos, atención veterinaria y la muerte de los animales [Holmes *et al.*, (2000); Desquesnes, (2004)]. Esto se traduce en una producción bovina difícil, deficiente y costosa llegando a ocasionar la necesidad de importaciones, lo implica grandes gastos a la nación para suplir las demandas de carne y leche de la población, atentando contra la seguridad agroalimentaria del país.

Generalmente en el campo, los animales se encuentran en fase crónica, donde la infección es asintomática y las parasitemias son crípticas, por lo que se hace necesaria la aplicación de un método sensible, capaz de diagnosticar animales con bajas parasitemias. Esporádicamente, en las zonas endémicas, ocurren brotes donde los animales presentan los principales signos de la fase aguda de la enfermedad, altas parasitemias, anemia y fiebre. En estos momentos resulta efectivo el uso de métodos de diagnóstico parasitológicos, tales como la observación directa al microscopio y la concentración por microhematocrito (CMH), los cuales son económicos y de fácil aplicación, pero presentan una baja sensibilidad ya que se fundamentan en la detección directa del parásito en sangre fresca [Ramírez-Iglesias *et al.*, (2011)]. Otro método comúnmente empleado en los laboratorios es la inmunofluorescencia indirecta y el ensayo inmunoenzimático

indirecto (ELISAI), los cuales se basan en la detección de anticuerpos relacionados con el agente causal de la enfermedad. Estos métodos son altamente sensible comparados con los anteriores y tienen la ventaja que permite la evaluación de un gran número de animales simultáneamente, pero poseen como desventaja la detección de falsos positivos, en los cuales el animal no presenta infección activa pero detecta los anticuerpos circulantes generados a partir de una anterior exposición al parásito, sin diferenciar a los animales que han sido tratados. Adicionalmente, este método resulta inespecífico debido a la reactividad cruzada existente entre los antígenos y los anticuerpos relacionados de las diferentes especies de tripanosomatídios [Luckins, (1977); Uzcanga *et al.*, (2002)]. Sin embargo, en el campo predominan las infecciones subclínicas o crónicas, donde la infección es asintomática y las parasitemias son crípticas. Estos animales pueden convertirse en reservorios, situación que representa un riesgo potencial de reactivación de la infección en condiciones de compromiso inmunológico, convirtiéndose en una fuente de infección para animales jóvenes [Suarez *et al.*, (2009)]. Por lo tanto, resulta adecuada la aplicación de un método sensible y específico, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), basado en la detección del ADN del parásito, capaz de detectar e identificar el agente patógeno en animales con bajas parasitemias. Esto con la finalidad de tomar medidas de control para mejorar la productividad de los rebaños y prevenir la aparición de

brotes.

En Venezuela se han realizado muy pocos estudios sobre la situación de la tripanosomosis en ganadería de altura. Por lo tanto, en el presente trabajo se plantea evaluar y comparar la prevalencia de la tripanosomosis por PCR, CMH y ELISAI en una población de bovinos de Laguneta de la Montaña, situada a más de 1300 metros en los Altos Mirandinos.

Métodos

Obtención de las muestras

Las muestras de sangre, aproximadamente 4 ml por tubo, fueron colectadas de la vena yugular mediante tubos vacutainer tanto en presencia como en ausencia de anticoagulante (EDTA) de un número representativo de los animales de cada sector: aproximadamente el 20% de bovinos adultos fueron seleccionados al azar. Se evaluaron 43 bovinos de 8 pequeñas unidades de producción ganadera situadas en Laguneta de la Montaña a 1300mts sobre el nivel del mar, en los altos Mirandinos. Las muestras fueron evaluadas parasitológica, inmunológica y molecularmente para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina.

Diagnóstico parasitológico por la Técnica de centrifugación de microhematocrito (CMH)

Se tomaron 70 µl de sangre con tubos capilares heparinizados y se centrifugaron durante 5 min. a 12.000 g. Luego se examinaron al microscopio de luz (objetivo 10X) para detectar los tripanosomas móviles cerca de la capa leucocitaria Woo (1970).

Diagnóstico molecular por PCR

Extracción de ADN

Se purificó el ADN utilizando el kit de purificación de ADN genómico (Wizard), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial Promega®. Un ml de sangre entera con anticoagulante se centrifugó (15.000 g durante 1 min.) para concentrar los parásitos en la capa leucocitaria y 300µl de esta capa se tomaron para extraer el ADN. La integridad de los ADN fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%.

Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN (ng/µl) se estimó espectrofotómetro a 260 nm, a partir de 1µl de la muestra, utilizando un NanoDrop™ 1000 (Thermo scientific).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se realizó empleando 300ng de ADN purificado, tomando en cuenta de forma previa la concentración de los ADN. Para el proceso de amplificación se utilizaron los primers específicos para *T. vivax* TWJ1/2 descritos por [Masake *et al.*, (1997)], los cuales están diseñados para hibridar con regiones cuyo producto génico es un antígeno reconocido por un anticuerpo monoclonal Tv27. Se emplearon 12,5µl de la mezcla de reacción Master Mix de la casa comercial Promega® con una concentración final de cada primer igual a 1µM.

Los productos de amplificación resultantes de la PCR fueron evaluados mediante geles de agarosa al 2% en una electroforesis horizontal, con las muestras corridas a 100 voltios por 1 hora. Una vez terminada la corrida del gel, se procedió a su visualización un trasluminador y digitalización de la

imagen.

Diagnóstico serológico/inmunológico

Ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISAI)

Los sueros se obtuvieron a partir de los tubos sin anticoagulantes por centrifugación (2000 g, 10 min). El extracto antigénico clarificado se preparó a partir de homogenato de *T. evansi* según [Uzcanga *et al.*, (2002)]. Placas de polivinilo de 96 pocillos fueron sensibilizadas durante toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C con 100 µl/pocillo del extracto antigénico clarificado (20 µg/ml) en 50 mM de tampón carbonato-bicarbonato (pH 9,6). A continuación se añadieron 200µl solución de bloqueo con leche descremada al 5% en 0,02 M PBS (pH 7,2). Después, se agregaron 100 µl/pocillo de suero de bovino, diluido 1/200 en PBS-T (0,1% de Tween 20 en PBS), seguido de 100 µl/pocillo del anticuerpo secundario anti-IgG de cabra anti (H + L) -bovino conjugada con peroxidasa, diluido 1/20000 en PBS-T. Entre cada etapa, se realizaron 3 lavados con 200 µl / pocillo de 150 mM NaCl, 0,1% de Tween 20. Las incubaciones se llevaron a cabo durante 1 h en una cámara húmeda a 37°C. Finalmente se añadió 100 µl / pocillo del cromógeno ABTS 2% (2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) diluido en 0,05 M de fosfato-citrato (pH 5,0), 0,5% de H₂O₂ y se agitó durante 30 min. La densidad óptica a 405 nm (OD405) se determinó con un lector de microplacas de ELISA (BioRad Modelo 3550). Para el diagnóstico serológico el punto de corte se determinó como la media más 3 veces la desviación estándar (X +3SD) de las lecturas de

OD405 de 20 sueros obtenidos de animales sanos, diagnosticados como negativos parasitológicamente por CMH y molecularmente por PCR.

Comparación de los métodos de diagnóstico.

Con el fin de comparar los métodos utilizados, el porcentaje (%) de la detección se calculó dividiendo el número de animales positivos por el número de animales evaluados por método, multiplicado por 100.

Resultados y Discusión

La tabla 1 resume los resultados obtenidos del diagnóstico para la tripanosomosis en una población de bovinos perteneciente a la zona de Laguneta de la Montaña. Se puede observar que de las 43

muestras evaluadas solo se obtuvieron 6 muestras positivas por la técnica de CMH, correspondiente a una detección del 13,9%, mientras que por el método molecular de PCR se obtuvieron 21, lo que corresponde a un 48,8% de detección. Las diferencias en los porcentajes de detección de ambas técnicas radican en su sensibilidad, correspondiendo un $2,5 \times 10^2$ parásitos por mililitro de sangre (p/ml) para la CMH y hasta 1p/ml para la PCR [Paris *et al.*, (1982); Masake *et al.*, (1997)]. Esto indica que las muestras negativas presentaban parasitemias por debajo del umbral de sensibilidad de la CMH, resultando en falsos negativos parasitológicos. De igual forma, todas las muestras que resultaron positivas por CMH fueron confirmadas por la PCR.

Tabla 1. Comparación de las técnicas de diagnóstico para la detección de tripanosomosis bovina

Nº de animal	CMH	ELISAI	PCR
1	+	+	+
2	+	+	+
3			
4		+	+
5		+	+
6		+	
7			
8		+	+
9			+
10			+
11			+
12		+	+
13		+	+
14		+	
15			+
16	+	+	+
17		+	+
18			
19	+		+
20			

21		+	+
22			
23			
24		+	
25			
26			
27			
28			
29		+	
30		+	
31			
32			
33	+		+
34	+	+	+
35			
36			
37			
38			
39		+	+
40		+	+
41		+	+
42		+	+
43			
Total	6	20	21
Porcentaje (%)	13,9	46,5	48,8

En la Figura 1 se muestra el análisis por electroforesis de los productos de amplificación obtenidos por PCR para las muestras diagnosticadas como positivas, los cuales corresponden a una banda del tamaño esperado, 400pb. Se emplearon como controles positivos (C⁺) y negativos (C⁻) ADN purificados provenientes de animales experimentalmente infectados y de regiones no endémicas respectivamente, junto con un control sin ADN (H). Adicionalmente, se observa que los animales que resultaron parasitológicamente positivos presentan una mayor intensidad en las bandas obtenidas en comparación con aquellos

diagnosticados como positivos únicamente por PCR. Esto se puede relacionar con el nivel de parasitemia presente en la muestra evaluada.

Por otra parte, mediante la técnica de ELISAi, se detectaron anticuerpos reaccionantes IgG anti-*Trypanosoma spp.* en 20 de las 45 muestras evaluadas, correspondiente al 46,5 % de detección (Tabla 1). En la figura 2 se muestran los valores de DO405 para cada uno de los animales evaluados, resultando positivos todos aquellos animales cuya lectura fue mayor al punto de corte establecido (0.341).

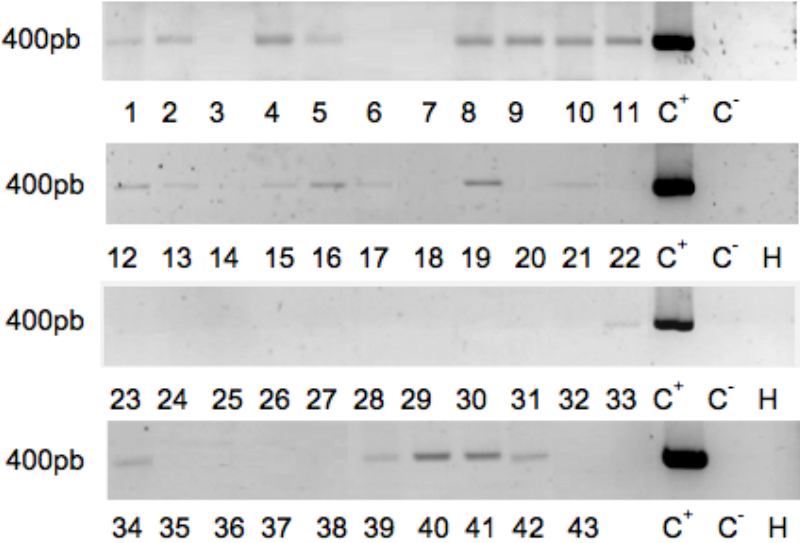


Figura 1. Productos de amplificación obtenidos por PCR a partir de las muestras de campo.

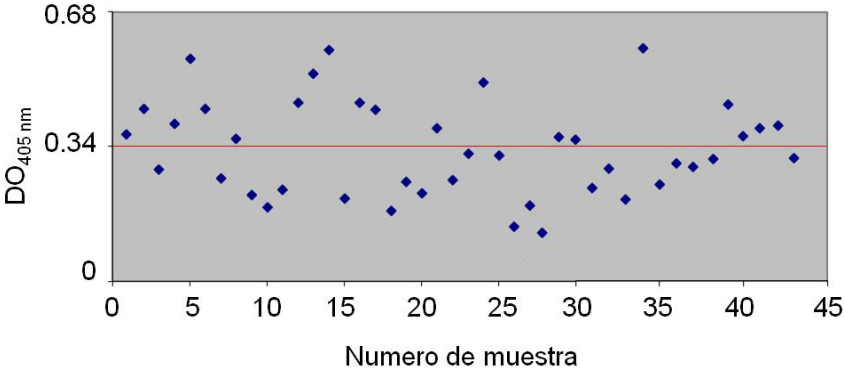


Figura 2. Densidades ópticas de las muestras registradas por ELISAi a partir de las muestras de campo

También se puede observar, en la Tabla 1, que animales positivos por PCR no presentaron altos títulos de anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma spp.* Esto podría atribuirse a que el antígeno empleado en el ELISAI fue un homogenato clarificado de *T. evansi*, por lo tanto la detección de los anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma sp.*, se basa en la reactividad cruzada existente entre los tripanosomatídios Luckins (1977). Por lo tanto, este método no identifica la especie involucrada en la infección. Sin embargo, se confirmó por PCR empleando los cebadores TWJ1/2 que la especie involucrada en los animales infectados era *T. vivax*, resultando negativos mediante la evaluación por la PCR empleando los cebadores especie específicos para *T. evansi* ESAG 6/7 [Holland *et al.*, (2001)]. No obstante, en los animales que presentan una infección reciente, la respuesta inmunológica no ha sido desarrollada y los niveles de IgG se encuentran muy bajos en estos animales infectados, situación propuesta por [Bolívar *et al.* (2006)] al realizar un estudio similar. Adicionalmente, los anticuerpos en animales tratados puede mantenerse por largos periodos en el tiempo [Monzón *et al.*, (2003)], limitando la capacidad de ELISAI para distinguir entre infecciones activas de aquellos animales que han sido tratados. En Venezuela, según estudios epidemiológicos, la trypanosomosis bovina está ampliamente distribuida, presentando un carácter enzootico, donde las parasitemias son crónicas y la mayoría de los animales presentan infecciones subclínicas [Simoes *et al.*, (2009)]. En su mayoría,

estos estudios han sido realizados en las regiones productoras de los llanos, donde se reportan las seroprevalencia más altas (20-60%) [Toro *et al.*, (1980); Suárez *et al.*, (2009); Tamasaúkas *et al.*, (2010)], contrastando con los pocos estudios realizados en regiones montañosas, como pie de monte andino, donde se reporta la ausencia de infección activa [Suárez *et al.*, (2009)] o muy bajas (2,8%) [Bolívar *et al.*, (2006)] con seroprevalencias de 10% [Suárez *et al.*, (2009)]. De allí la importancia de evaluar la situación de la tripanosomosis en Laguneta de La Montaña, donde se practica la ganadería de altura, encontrándose una prevalencia mucho mayor a las registradas en otras investigaciones llevadas a cabo en zonas similares. La prevalencia de casi 50% reportada podría estar asociada a alteraciones en los parámetros meteorológicos y la distribución de los vectores (tábanos y moscas) que ha ocurrido en la zona, como lo expresan los habitantes de la comunidad en estudio, aunado al desplazamiento de animales posiblemente infectados desde los llanos a estas zonas. En efecto, las variaciones en los factores climáticos, como aumentos de la temperatura, podrían incidir en la una mayor capacidad de supervivencia de los vectores transmisores de los agentes etiológicos de varias enfermedades, provocando la diseminación de la enfermedades en zonas altas de países tropicales [Ramasaúmy *et al.*, (2012)]. Dentro de este último punto, es importante destacar que el trabajo con las comunidades presentes en la zona donde se realizaron los muestreos podrá permitir, en un futuro, una

mejor capacitación de las unidades de producción con base en la cultura de la prevención y desarrollo de estrategias que permitan atenuar los efectos negativos de esta enfermedad sobre la productividad de los rebaños.

Conclusiones

Los resultados indican que la PCR es el método más sensible y específico para la detección de la tripanosomosis bovina. Cabe resaltar que en nuestro país existen muy pocos trabajos epidemiológicos empleando como método de diagnóstico la PCR, por lo tanto, recomendamos su uso para conocer la situación real de esta parasitosis en los rebaños del país, incluyendo las zonas de ganadería de montaña situadas a mas de 1000 metros sobre el nivel del mar, con la finalidad de tomar las medidas sanitarias pertinentes y así mejorar la productividad de los rebaños nacionales, garantizando la seguridad alimentaria.

Agradecimientos

Trabajo financiado por el MPPCTI, FONACIT. Proyecto estratégico N° 210022000981

Referencias Bibliográficas

Bolívar, A.M; García-Lugo, P; Crisante, G; Rojas, A; Teixeira, M; Añez, N. (2006). Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. Boletín de Malaria y Salud Ambiental. 87-90.
Desquesnes, M. (2004). Livestock Trypanosomes and their Vectors in

Latin America. Centre de cooperation internationale en recherché agronomique pour le développement (CIRAD)/ Élevage et médecine vétérinaire tropical (EMVT). OIE Paris. 174 pp

Holland, G; Claes, F; My, L.N; Than, N.G; Tam, P.T; Verloo, D; Büscher, P; Goddeeris, B; Vercruysse, J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. Veterinary Parasitology. 97: 23–33.

Holmes, P.H; Katunguka-Rwakishaya, E; Bennison, J.J; Wassink, G.J; Parkins, J.J. (2000). Impact of nutrition on the pathophysiology of bovine trypanosomiasis. Parasitology. 120:73-85.

Luckins, A.G; Gray, A.R; Rae, P. (1977). Comparison of diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme-Linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with *Trypanosoma evansi* in rabbits. Annals of Tropical Medicine Parasitology. 72: 449-441.
Masake, R.A; Majiwa, P.A.O; Moloo, S.K; Makau, J.M; Njuguna, J.T; Maina, M; Kabata, J; Ole, Loi. Yoi. OK; Nantulya, V.M. (1997). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. Experimental Parasitology. 85: 193–205.

Monzón, C. M; Mancebo, O. A; Ruso, A. M. (2003). Antibody levels by indirect ELISA test in *Trypanosoma evansi* infected horses following treatment with quinapyramine sulphate. Veterinary Parasitology. 111: 59–63.

Paris, J; Murray, M; McOdimba, F. (1982). A comparative evaluation of

the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Tropical*. 39: 307–316

Ramasamy, R; Surendran, S.N. (2012). Global climate change and its potential impact on disease transmission by salinity-tolerant mosquito vectors in coastal zones. *Frontiers y Physiology*. 3: 198.

Ramírez-Iglesias, J.R; Eleizalde, M.C; Piñeres-Gómez, E; Mendoza, M. (2011). *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Experimental Parasitology*. 128 (1):91-96.

Simoes, D; Sánchez, M; Yllenck, G; Rivera, F; Parra, R; Quijada, J; García, F. (2009). Brote de tripanosomosis en un rebaño doble propósito del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela. *Ciencia*. 17(2): 124-132.

Suarez, C; García, F; Román, D; Coronado, A; Perrone, T; Reyna, A; Parra, N. (2009). Factores de riesgo

asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones de Venezuela. *Zootécnica Tropical*. 27(4): 363-372.

Tamasaukas, R; Agudo-Castellanos, L; Silva-Ravelo, A; Florio-Luis, J; Vintimilla-Tamasaukas, M; Rivera-Pirela, S. (2010). Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: Una revisión. *Agronomía Mesoamericana*. 21 (2): 383-386.

Toro, M; León, E; López, R; García, J.A; Ruiz, A. (1980). Resultado de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Veterinaria Tropical*. 5: 43-50.

Uzcanga, G; Mendoza, M; Aso, P; Bubis, J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*. 124: 287-299.

Woo, P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African Trypanosomiasis, *Acta Tropical*. 27: 384-386.