



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE ZOOLOGÍA AGRÍCOLA
POSTGRADO DE ENTOMOLOGÍA**



TESIS DOCTORAL

para optar al título de
Doctor en Ciencias en Entomología

**EVALUACIÓN MULTIFACTORIAL DE LA TRIPANOSOMOSIS ANIMAL
Y SUS VECTORES, EN UN HATO DE LOS LLANOS VENEZOLANOS.
PROPUESTA DE ESTUDIO INTEGRAL PARA EXPLOTACIONES RURALES**

Tutor:

Dr. Alfredo Mijares

Autora:

M.V. Ariadna Rangel Rivas

Comité Asesor:

Dra. Mary Isabel Gonzatti

Dr. Augusto Henriques

Maracay, Diciembre de 2015

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de Tutor de la tesis presentada por la ciudadana **Ariadna Rangel Rivas**, para optar al grado de Doctor en Ciencias en Entomología, cuyo título es: **Evaluación multifactorial de la tripanosomosis animal y sus vectores, en un hato de los llanos venezolanos. Propuesta de estudio integral para explotaciones rurales**; considero que este manuscrito reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la Ciudad de Maracay, a los 09 días del mes de Diciembre de 2015

Dr. Alfredo Mijares Rodríguez
CI. 5.530.962

RECONOCIMIENTOS

Esta investigación contó con el financiamiento del proyecto **Misión Ciencia N° 2007-001425**, titulado: Inmunodiagnóstico de enfermedades hemoparasitarias de bovinos y equinos; con el financiamiento y apoyo infraestructural y logístico del **Laboratorio de Fisiología de Parásitos**, perteneciente al Centro de Biofísica y Bioquímica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (CBB-IVIC), a través de sus proyectos N° 305, titulado: Tripanosomiasis humana y animal y N° 1365, titulado: Hemoparásitos patógenos al hombre y a los animales; y con el apoyo técnico, infraestructural y logístico de la compañía **AGROFLORA c.a.**

*Dedicado
con especial afecto
a Loly Rivas y a Trina Perrone,
mis eternas ángeles guardianes*

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
INSTITUTO DE ZOOLOGÍA AGRÍCOLA
POSTGRADO DE ENTOMOLOGÍA

Evaluación multifactorial de la tripanosomosis animal y sus vectores, en un hato de los llanos venezolanos. Propuesta de estudio integral para explotaciones rurales

Autora: Ariadna Rangel Rivas
Tutor: Alfredo Mijares Rodríguez
Fecha: 10 de Diciembre de 2015

Diversos autores discuten sobre el papel de las especies de Tabanidae como transmisores de una considerable variedad de agentes patógenos de naturaleza viral, bacteriana y/o parasitaria, entre los cuales son considerados de gran importancia en medicina veterinaria los hemotrópicos, como los tripanosomas, causantes de la tripanosomosis animal, uno de los protozoarios más ampliamente difundidos en nuestro país y los más difíciles de controlar y erradicar de los rebaños, sobretodo en producciones pecuarias de tipo extensivo.

En tal sentido, este trabajo propone la generación de un plan piloto para la evaluación de enfermedades metaxénicas causadas por hemotrópicos en unidades de producción de ganadería extensiva, mediante la puntualización y estudio integral de cada uno de los factores involucrados en esta patología ampliamente distribuida a nivel nacional, seleccionando cada uno de los factores (vector, hospedero, reservorio y patógeno) de acuerdo a su importancia en el sector pecuario.

Para ello se caracterizó taxonómicamente la población de Tabánidos presente en un área de un hato ganadero en el estado Apure; se estableció la dinámica estacional de dicha población, tomando en cuenta pluviosidad y temperaturas máxima y mínima; se realizaron análisis de estadística descriptiva e inferencial bayesiana; se determinó, mediante PCR, la presencia de tripanosomas en el tracto digestivo de tabánidos alimentados en campo; se asoció animales de producción y silvestres como fuente de alimentación de los tabánidos capturados; se determinó, mediante ELISA indirecto, la prevalencia serológica inicial del parásito en un grupo de bovinos expuestos naturalmente al vector y la dinámica de anticuerpos posterior al tratamiento profiláctico con una droga tripanocida.

Palabras clave:

Ganadería, hemotrópico, hospedero, reservorio, vector.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO GENERAL	4
III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
V. METODOLOGÍA	30
1. Selección de la unidad de producción	30
2. Muestreo entomológico	31
3. Identificación taxonómica	35
4. Análisis estadísticos	36
5. Disección de tracto digestivo	37
6. Diagnóstico molecular de tripanosoma en tabánidos alimentados	38
6.1. Alimentación experimental de tabánidos con sangre de ratas sanas e infectadas con tripanosoma	38
6.2. Estandarización de la técnica de PCR empleando muestras de tábanos alimentados experimentalmente con ratas	40
6.3. Diagnóstico de <i>T. evansi</i> y <i>T. vivax</i> en muestras de tabánidos alimentados en campo	42
7. Determinación molecular de la fuente de alimentación de tabánidos	43
8. Muestreo de los animales de producción	45

9. Aplicación de tratamiento tripanocida a los animales de producción y diagnóstico serológico de <i>Trypanosoma</i> spp mediante ELISAI	46
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
1. Listado de especies de tabánidos y abundancia	49
2. Distribución estacional de las especies de tabánidos para la zona en estudio	57
3. Análisis estadísticos	60
4. Diagnóstico molecular de tripanosoma en tabánidos alimentados	68
4.1 Alimentación experimental de tabánidos	68
4.2. Determinación de la presencia de <i>Trypanosoma evansi</i> , en tabánidos alimentados con sangre	69
4.3. Diagnóstico de <i>T. evansi</i> y <i>T. vivax</i> en muestras de tabánidos alimentados en campo	72
5. Identificación molecular de la fuente de alimentación de tabánidos mediante secuencias de citocromo b	75
6. Dinámica de la seroprevalencia de <i>Trypanosoma</i> spp. en un grupo de novillas tratadas de forma profiláctica	83
VII. CONCLUSIONES	86
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
IX. ANEXOS	101

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Familia Tabanidae	6
Figura 2. Morfología externa de Tabanidae	7
Figura 3. Fases del desarrollo en Tabanidae	9
Figura 4. Morfología externa de <i>Trypanosoma</i> sp.	18
Figura 5. Trampa Canopy	23
Figura 6. Distribución aleatoria de las trampas	32
Figura 7. Dispositivo adaptado para la alimentación experimental de tabánidos	33
Figura 8. Toma de muestra sanguínea mediante punción coccígea	34
Figura 9. ELISA indirecto para el diagnóstico positivo de <i>Trypanosoma</i> spp.	40
Figura 10. Toma de muestra sanguínea mediante punción coccígea	46
Figura 11. Especies de tabánidos colectados	50
Figura 12. Colección entomológica generada, depositada en MIZA	53
Figura 13. Fluctuación estacional de tabánidos	58
Figura 14. Análisis de componentes principales en base a trampa de colecta	61
Figura 15. Análisis de componentes principales en base a época del año	63
Figura 16. Análisis de componentes principales en base a hora del día	64

Figura 17. Análisis de coinerencia por mes de los dos grupos de datos	66
Figura 18. STATIS por mes en base a especies colectadas	67
Figura 19. STATIS por trampa en base a especies colectadas	68
Figura 20. Resultados en geles de agarosa para la estandarización de la PCR para diagnóstico de <i>Trypanosoma</i> spp. con cebadores ITS	70
Figura 21. Resultado en geles de agarosa de PCR para diagnóstico de <i>Trypanosoma</i> spp. con cebadores ITS	73
Figura 22. Resultado en geles de agarosa de PCR para diagnóstico diferencial entre <i>T. evansi</i> y <i>T. equiperdum</i> con cebadores del maxicírculo	74
Figura 23. Distribución de hospederos para cada especie de la familia tabanidae capturada alimentada en campo	76
Figura 24. Número de animales positivos vs. negativos y porcentaje de prevalencia en relación a la población muestreada trimestralmente	84

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I. Número de ejemplares capturados por especie y por mes de colecta	51
Tabla II. Resultados del análisis BlastN de las secuencias de citocromo b obtenidas de tabánidos alimentados en campo	82

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Diagrama del dispositivo empleado para la alimentación experimental de tabánidos con ratas sanas e infectadas con <i>Trypanosoma evansi</i> .	101
Anexo 2. Alineamiento de secuencias de <i>Ardea herodias</i> (garza azulada)	102
Anexo 3. Alineamiento de secuencias de <i>Bos taurus</i> (vaca doméstica)	103
Anexo 4. Alineamiento de secuencias de <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> (Chigüire)	104
Anexo 5. Alineamiento de secuencias de <i>Rattus norvegicus</i> (Rata gris o rata de alcantarilla)	105
Anexo 6. Alineamiento de secuencias de <i>Ardea alba</i> (garza blanca)	105
Anexo 7. Alineamiento de secuencias de <i>Bubalus bubalis</i> (búfalo)	106
Anexo 8. Alineamiento de secuencias de <i>Caiman crocodilus</i> (baba)	107
Anexo 9. Alineamiento de secuencias de <i>Odocoileus virginianus</i> (Venado de cola blanca)	108
Anexo 10. Trabajo publicado en revista científica en el marco de esta tesis doctoral	109
Anexo 11. Trabajos publicados en congresos en el marco de esta tesis doctoral	114

I. INTRODUCCIÓN

Cuando nos encontramos en presencia de un problema multifactorial, tal una patología, el estudio de cada uno de los elementos involucrados puede ser la mejor manera de combatirlo. Si consideramos la existencia de los siguientes elementos: vector, hospedero, reservorio y patógeno; entendemos que a su vez, éstos conforman una red compleja de aspectos ecológicos, biológicos, epidemiológicos y sanitarios, entre otros; enfocados a obtener conocimientos que conlleven controlar el problema, a fin de alcanzar una situación de equilibrio, en la que cada uno de los factores convivan sin detrimento de ninguno.

En algunas unidades de producción ganadera, no se implementan medidas preventivas de control sanitario y cuando se presenta una patología que causa pérdidas en el rendimiento productivo, suele atacarse de forma inmediata con medidas sanitarias curativas, lo cual genera un aumento en los costos de producción que, en algunos casos, puede provocar que la relación costo/beneficio no sea del todo satisfactoria. En otros casos, las unidades tienen bien definidos sus planes sanitarios, establecidos en función del historial de enfermedades que les hayan afectado en el pasado, sin embargo, estos planes no siempre son evaluados para determinar su eficacia real y suelen ser aplicados un año tras otro sin conocimiento de si están o no prestando los resultados deseados.

Lo cierto es que, en muchos casos, el elemento vector es desplazado de las medidas de control sin tomarse en cuenta que, además de participar en la transmisión de patógenos, tiene efectos negativos directos sobre el hospedero y su producción, tales como problemas de piel (laceración, erupción, alergia y miasis) que deprecian el valor del cuero en el mercado; estrés directo al animal, lo cual disminuye el tiempo de pastoreo y descanso; y pérdida de sangre, tanto por el consumo directo del insecto como por el sangrado que continúa una vez que el vector abandona al hospedero; se ha determinado que un tábano consume aproximadamente 0,5 ml por picadura [40].

Resulta complejo calcular las pérdidas económicas reales que producen los artrópodos hematófagos en la industria ganadera, sin embargo se han realizado estimaciones aproximadas. En 1965, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos estimó pérdidas de US\$ 40 millones atribuidas a ataques de tabánidos al ganado; de éstos US\$ 30 millones se deben a disminución de la ganancia de peso [40]. También ha sido demostrado experimentalmente que animales tratados con piretrinas sinérgicas como medida para el control de tabánidos, ganan más peso que animales no tratados [14].

Por otra parte, se ha reportado un estimado anual total de US\$ 158.000 por beneficio económico neto gracias al control efectivo contra surra (enfermedad causada por

Trypanosoma evansi) de un pueblo típico de una zona de riesgo moderado a alto en Mindanao, Filipinas. El valor añadido de los búfalos, vacas, caballos, cabras u ovejas y cerdos como resultado de este control correspondió a US\$ 88, \$84, \$151, \$7, \$114 por animal por año, respectivamente [23, 24].

Teniendo esto en cuenta, si nos enfocamos en la posibilidad de predecir la ne aparición o recidiva de una enfermedad o, aún más posible, conocer el comportamiento particular de cada uno de los factores que la afectan dentro de la unidad de producción, seríamos capaces de establecer las medidas sanitarias necesarias en el momento oportuno, es decir, cuando realmente se requieran, de forma que el problema sea tratado de forma preventiva y las medidas aplicadas sean eficaces en la disminución de las pérdidas y aumento de la producción. Cada unidad de producción es diferente, sin embargo se pueden estudiar y generar procedimientos de evaluación generalizados y con medidas de resolución aplicables a cualquier explotación.

En tal sentido, este trabajo propone la generación de un plan piloto para la evaluación de enfermedades metaxénicas causadas por hemotrópicos en unidades de producción de ganadería extensiva, mediante la puntualización y estudio sistemático de cada uno de los factores involucrados en una patología ampliamente distribuida a nivel nacional, como lo es la tripanosomosis animal; seleccionando

cada uno de los factores de acuerdo a su relevancia en el sector pecuario de la siguiente manera:

- 1) vector: Tabanidae,
- 2) hospederos: equinos y bovinos,
- 3) reservorios: mamíferos silvestres principalmente,
- 4) patógenos: tripanosomas *Trypanosoma evansi* y *T. vivax*

II. OBJETIVO GENERAL

Evaluar e integrar los factores involucrados en la dinámica estacional de la tripanosomosis animal durante un período de un año, en una unidad de producción de una zona endémica.

III. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar taxonómicamente la población de tabánidos presente en un área de un hato ganadero del municipio Muñoz del Estado Apure.
- Establecer la dinámica estacional de dicha población tomando en cuenta pluviosidad y temperaturas máxima y mínima.

- Determinar la presencia de tripanosomas en el tracto digestivo de tabánidos alimentados mediante la técnica de PCR.
- Determinar y asociar animales de producción como fuente de alimentación de los tabánidos capturados mediante la técnica de PCR.
- Determinar y asociar animales silvestres como fuente de alimentación de los tabánidos capturados mediante la técnica de PCR.
- Determinar, mediante ELISAI, la prevalencia serológica inicial del parásito en un grupo de bovinos expuestos naturalmente al vector.
- Establecer, mediante ELISAI, la dinámica serológica en los bovinos, posterior al tratamiento profiláctico con una droga tripanocida.

IV. MARCO TEÓRICO

Tabanidae (Diptera), es una familia de moscas, comúnmente llamadas tábanos y en inglés “horse-fly” (mosca del caballo), en su mayoría robustas, que varían en tamaño de 6 a 30 mm de envergadura. Por lo general de color marrón, negro o gris, pudiendo presentar un patrón distintivo de líneas o manchas oscuras o claras (Fig. 1). También pueden ser de color amarillo, verde o colores metálicos [15].

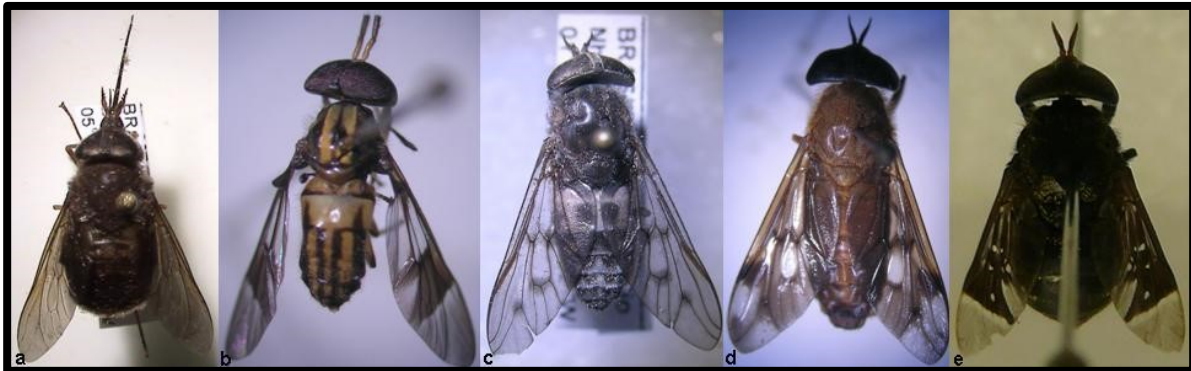


Figura 1. Familia Tabanidae: a. *Pityocera (Elaphella) cervus* b. *Chrysops* sp. c. *Poeciloderas* sp. d. *Catachlorops (Psarochlorops)* e. *Lepiselaga crassipes*.

Una de sus características distintivas principales es que los ojos ocupan gran parte de la cabeza, que es relativamente grande, y están separados en las hembras (condición dicóptica) (Fig. 2.a) y unidos en los machos (condición holóptica) [15] (Fig. 2.b), excepto en especies de *Scepsis*, *Mycteromyia*, *Silvestrielluse* y *Caenopangonia*, donde ambos sexos son dicópticos [20]. Las antenas son alargadas o cortas, dependiendo de la especie, y trisegmentadas (escapo, pedicelo y flagelo). El flagelo puede presentar en la placa basal una espina dorsal de longitud variable, con ángulo agudo u obtuso; además está subdividido en flagelómeros en número de 4 a 8 (Fig. 2.c). La proboscis es alargada, a veces muy alargada, a menudo esclerotizada y la labela es grande en la mayoría de especies. El empodio tarsal es pulviliforme (Fig. 2.d), como en otros Brachycera inferiores. En el ala la celda discal es grande y las venas R4 y R5 divergen en la parte apical del ala para encerrar la punta (Fig. 2.e). Muchas especies presentan alas teñidas o un patrón de marcas claras y oscuras [15].

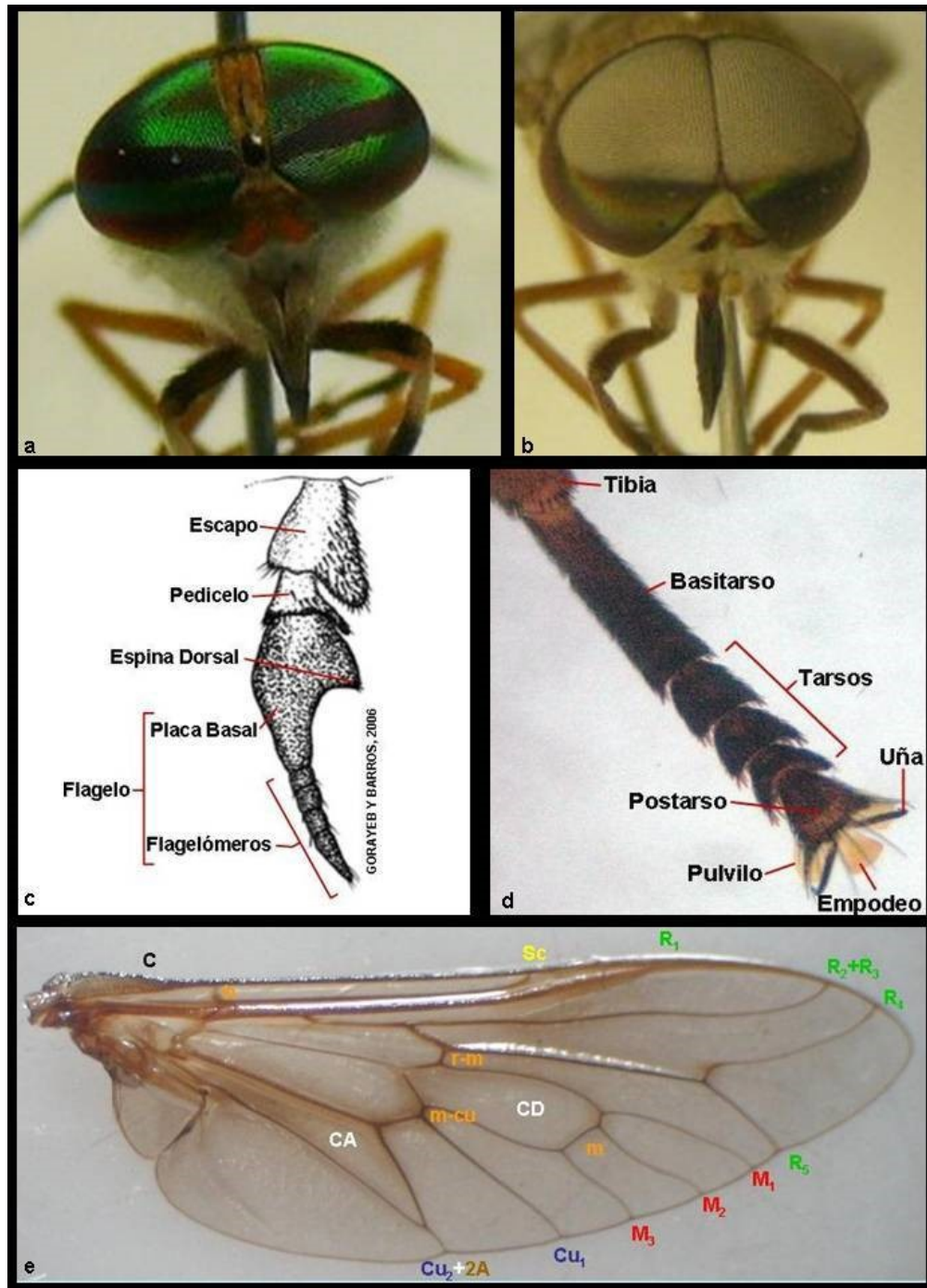


Figura 2. **Morfología externa de Tabanidae:** a. Condición dicóptica en hembra. b. Condición holóptica en macho. c. Antena (Tomado de Gorayeb y Barros, 2006). d. Pata. e. Fórmula alar: Venas longitudinales C: Costa, Sc:Subcosta, R:Radial, M:Media, Cu:Cubital, A:Anal. Venas transversales h: humeral, r-m: radial-medial, m:medial, m-cu:medial-cubital. Celdas CD:Discal, CA:Anal.

Los tábanos son insectos holometábolos, es decir con metamorfosis completa (huevo-larva-pupa-adulto). Las hembras ponen sus huevos en grupos de 100 a 800 [15], en áreas abrigadas sobre hojas, rocas, troncos, etc. (Fig. 3.a); la eclosión ocurre entre 5 a 7 días posterior a la postura. Las larvas (Fig. 3.b) se desarrollan en vegetación en descomposición, suelo húmedo y algunos ambientes acuáticos, incluyendo orillas de mar; son principalmente carnívoras y muy voraces, alimentándose de lombrices de tierra, grillos, larvas de diversos insectos, coleópteros adultos, gusanos, y artrópodos en general, llegando incluso al canibalismo. El desarrollo larval ocurre en un intervalo de 6 a 13 instares (etapas entre mudas) y es un proceso lento que puede durar desde unos pocos meses hasta varios años, dependiendo de las condiciones climáticas. Una vez formada la pupa (Fig. 3.c), transcurren de 5 a 20 días para el desarrollo y emergencia del imago o adulto [73] (Fig. 3.d).



Figura 3. **Fases del desarrollo en Tabanidae:** a. Masa de huevos. b. Larva. c. Pupa. d. Adulto (Fotografías a,b y c de Sturgis McKeever, tomadas de <http://www.insectimages.org>)

Los adultos comúnmente permanecen en ambientes pantanosos o húmedos con vegetación abundante, generalmente en sotobosques; pudiendo alimentarse dentro o fuera de estos, es decir en sabanas abiertas, regularmente en el período del día de mayor luminosidad. Se ha demostrado además que prefieren hospederos cuya piel o pelaje presente colores oscuros; de hecho en un mismo animal con patrones de manchas (Ej. Caballo pinto o ganado Holstein) prefieren alimentarse sobre las áreas oscuras del cuerpo en lugar de las claras [9].

Existen excepciones a estas reglas generales. Algunas especies se desarrollan en ambientes secos o en sabanas abiertas, otras tienen hábitos crepusculares o

nocturnos y unas pocas carecen de aparato bucal succionador, por lo que se alimentan de polen o néctar al igual que lo hacen los machos.

Sistemáticamente siguen la siguiente clasificación taxonómica:

Reino	Animalia
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
Orden	Diptera
Suborden	Brachycera
Superfamilia	Tabanoidea
Familia	Tabanidae
Subfamilias	Pangoniinae
	Chrysopsinae
	Tabaninae

Las tres subfamilias conocidas (Pangoniinae, Chrysopsinae y Tabaninae), poseen notables características morfológicas que permiten su diferenciación: Ocelos bien desarrollados presentes en Pangoniinae y Chrysopsinae y ausentes en Tabaninae. El estilo del flagelo subdividido en 7 a 8 flagelómeros en Pangoniinae; reducido a 4 en Chrysopsinae y 3 ó 4 en Tabaninae. Las tibias posteriores pueden o no presentar un par de espuelas apicales, las cuales son bien desarrolladas en Pangoniinae, ausentes o difíciles de ver en Chrysopsinae y ausentes en Tabaninae [15].

Las subfamilias son a su vez divididas en tribus, en la región neotropical se reconocen tres para Pangoniinae (Pangoniini, Scepsidini y Scionini) y dos para Chrysopsinae (Chrysopsini y Rhinomyzini) y Tabaninae (Diachlorini y Tabanini).

Según la última revisión del *Nomenclator Status Statistics Systema Dipteriorum* la familia Tabanidae posee a nivel mundial 4.406 especies agrupadas en 229 géneros [70], mientras que en la región neotropical se reconocen 1.205 especies [52], cifra que corresponde tan solo al 27,35% de las conocidas en el mundo.

Sin embargo, se considera que la biodiversidad en los países neotropicales aún no se conoce en su totalidad y muchas especies no han sido reportadas o descritas. Para el caso específico de Venezuela, a principio de los años cincuenta, Callan reportó tan sólo 88 especies, recalcando que se habían realizado muy pocas colectas y concluyendo que esta cifra guarda poca relación con lo que potencialmente podríamos encontrar en el país [16].

Previo a esto, los primeros estudios en Tabanidae fueron llevados a cabo por Surcouf y González-Rincones y publicados en su libro “Essai sur les Diptères vulnérante de Venezuela. Deuxième partie: Diptères brachycères”, en París en el año 1912, en el que citan 11 especies [10, 13]. Trece años más tarde, Adolfo Lutz, quien para la fecha gozaba de gran renombre en Brasil, su país natal, es invitado por el entonces presidente de la República, General Juan Vicente Gómez, con el objetivo de organizar el Departamento de Zoología de la UCV. En su viaje, Lutz tuvo la oportunidad de trabajar en compañía de Núñez Tovar, en la vertiente sur del Parque Nacional Henri Pittier, en Maracay, y zonas aledañas a la capital, realizando

diversas colectas y plasmando sus resultados tres años después en el trabajo titulado “Estudios de Zoología y Parasitología Venezolanas”, el cual contiene una sección dedicada exclusivamente a la Familia Tabanidae [10].

En este trabajo, Lutz, a través de una extensa revisión, tanto de literatura como de colecciones de diversos museos de Europa y del material colectado por Núñez Tovar, Werner, Tejera y su persona, encuentra 35 especies para Venezuela, a pesar de existir para la fecha más de 100 especies reconocidas en regiones limítrofes, esto se debe al hecho de que muchos ejemplares se encontraban etiquetados sin localidad o sólo como “América del Sur”, dificultando de esta forma la identificación de las localidades de colecta. También confirma siete de las especies reportadas por Surcouf y González Rincones en 1912; y publica, además, una lista de especies conocidas a la fecha que incluye: 29 especies conocidas reportadas con anterioridad en Venezuela, 4 especies no reportadas en el país y 1 especie nueva (*Myiotabanus sarcophagoides* Lutz, 1928); además incluye una descripción de la metamorfosis de *Lepidoseлага lepidota*, un resumen sobre bibliografía de tabánidos en Venezuela y países vecinos, una lista de publicaciones sobre tabánidos, un listado de sus propios trabajos sobre tabánidos en Brasil y países limítrofes y 18 estampas a color realizadas por Raymundo Honorio [10].

En los años sucesivos se produjo un vacío investigativo, luego del cual destacan los trabajos realizados por Pechuman en 1942 [72], Stone en 1944 [95], Callan en 1953

[16], Fairchild y Ortiz en 1955 [36] y Briceño-Iragorry en 1956 [13], para esa fecha se reconocían 137 especies en el país. Más recientemente, la situación no ha cambiado mucho y los trabajos en el área continúan siendo escasos, contando con los aportes de Gómez y Zavala en 2003, quienes señalan doce especies pertenecientes a ocho géneros en su inventario realizado a 243 especímenes del Museo de Entomología Dr. Rodolfo Bastidas, UNEFM [46], y Jiménez, García y Zambrano quienes, también en 2003, realizaron capturas en los municipios Miranda y Petit del estado Falcón, señalando nueve especies en cinco géneros [59]; ambos grupos presentaron brevemente sus resultados en el XVIII Congreso Venezolano de Entomología de ese año. Finalmente, merecen especial mención los trabajos de Velásquez en 2004 y Tiape en 2005, quienes, mediante sus publicaciones en extenso sobre estacionalidad e identificación taxonómica de tabánidos, reabren las puertas a este amplio campo de estudio en nuestro país [105, 112].

De manera general son pocos los trabajos referentes a estos vectores presentados en congresos, simposios, etc., a pesar de los esfuerzos encaminados a la organización de diversos cursos y charlas que se han venido ofreciendo en años recientes y han contado con la presencia de importantes investigadores internacionales en el área, como lo fueron el “I Curso de taxonomía de Tabanidae neotropicales”, organizado en el 2004, por el Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV-Maracay, y el “Curso de ecología de vectores (Tabanidae) y transmisión mecánica de agentes patógenos de interés veterinario”, llevado a cabo

en año 2007, en la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV-Maracay, entre otros eventos organizados en diversas universidades e institutos de investigación del territorio nacional.

Dada la poca información sobre análisis estadísticos y matemáticos en fenómenos de estacionalidad y comportamiento de Tabanidae disponible en la literatura, tanto a nivel nacional como mundial, se empleó en este estudio una combinación de novedosas técnicas tanto descriptivas como inferenciales, cuyos atributos principales son la posibilidad de describir e interpretar datos de diferentes tipos, que requieren de diferentes métricas y que permiten la correlación de múltiples variables, de ahí que se les denomine análisis multivariante. Entre estas técnicas se encuentran los análisis de componentes principales (ACP), análisis de coinerencia, STATIS y COSTATIS, el cual resulta de una combinación de STATIS y coinerencia.

El análisis de componentes principales (ACP), fue propuesto inicialmente por Pearson en 1901 y desarrollado por Hotelling en 1933 [22]. Se utiliza para reducir la dimensionalidad de los datos y determinar el comportamiento de los componentes que causan la variabilidad del conjunto [114]. La varianza de mayor tamaño en el conjunto, es capturada en el primer eje, la segunda varianza en el segundo eje y así sucesivamente, reteniendo aquellas características que contribuyen más a la variabilidad del conjunto. A partir de las transformaciones realizadas mediante ACP pueden aplicarse los otros métodos mencionados.

Cuando una tabla de datos contiene la composición de especies en determinados lugares de muestreo y otra matriz contiene información ambiental en los mismos lugares, la estructura común a estas dos ordenaciones, denominada co-estructura, puede ser analizada utilizando análisis de coinerencia [25, 29].

STATIS, cuya abreviación proviene del francés de “Structuration des tableaux a trois indices de la statistique”, que podría traducirse como “estructuración de conjuntos de datos de tres vías en estadística”, se puede emplear cuando el conjunto de datos no tiene la misma dimensión de columnas y/o filas (estructura trilineal imperfecta). La varianza de cada tabla se pondera en función de las similitudes entre ellas, lo que da el carácter de tres vías al método y hace que el análisis resulte más robusto y fácil de interpretar. Puede ser considerado como un ACP desplegado con una ponderación especial de la varianza de las tablas individuales [56].

En conjunto, la aplicación de estas técnicas aporta un carácter de relevada importancia a la investigación al permitir analizar todos los datos recabados en campo de una forma en que la estadística clásica no lo permitiría, todo ello con la finalidad de enriquecer los conocimientos sobre esta familia de moscas que, como se ha mencionado previamente, son consideradas un serio problema de salud pública y animal, debido a que sus hembras requieren alimentarse de sangre para completar el desarrollo de sus huevos, proceso fisiológico conocido como

anautogenia, y gracias a este hábito hematófago tienen la capacidad de actuar como transmisores mecánicos y, en menor grado, biológicos de un gran número de patógenos que afectan tanto a humanos como a animales silvestres y de producción. Factores como la baja persistencia y la alimentación interrumpida los convierte en vectores muy eficientes, sobre todo cuando la distancia entre un hospedero y otro es corta. Este efecto ha sido estudiado, encontrándose que a mayor distancia entre hospederos es menor el intercambio de tabánidos y demostrándose estadísticamente que el 95% de los tabánidos retornan a su hospedero original a una distancia de 39,6 m y el 99% a 49,3 m [38]. Resultados similares fueron obtenidos más recientemente en Brasil, donde encontraron que al separar dos caballos, a una distancia de 25 m, se transfiere sólo el 4,6% (n=1618) de los tábanos cuya alimentación fue intencionalmente interrumpida, mientras que a 50 m no hay transferencia de tabánidos (n=944) entre hospederos [8]. Sin embargo, en la práctica no es factible separar los animales ni siquiera en explotaciones extensivas, donde el espacio no supondría un problema, debido a los hábitos gregarios de los bovinos y equinos.

Diversos autores discuten sobre el papel de las especies de Tabanidae como transmisores de una considerable variedad de agentes patógenos de naturaleza viral, bacteriana y/o parasitaria [39, 63, 111], entre los cuales son considerados de gran importancia en medicina veterinaria y producción de grandes animales

aquellos conocidos como hemotrópicos, es decir los que tienen afinidad por componentes sanguíneos.

Entre éstos, los tripanosomas, causantes de la enfermedad denominada tripanosomosis, se caracterizan por ser quizás los más ampliamente difundidos [33] y los más difíciles de controlar y erradicar de los rebaños, debido a factores como: estrategias de evasión del sistema inmune que poseen estos protozoarios (variación antigénica), lo cual dificulta la generación de tratamientos profilácticos, como vacunas; resistencia del parásito a las terapias curativas disponibles; capacidad de ser transmitidos mecánicamente con facilidad, tanto por vectores como en forma iatrogénica; dificultad logística y altos costos del control de vectores, sobretodo en producciones pecuarias de tipo extensivo.

Los tripanosomas son protozoarios del orden Kinetoplastida perteneciente a la familia Trypanosomatidae y presentan la siguiente clasificación taxonómica [94]:

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>

Son hemoflagelados unicelulares, es decir parásitos consistentes de una sola célula flagelada (Fig. 4), activamente móviles que viven en la sangre y en la linfa, de donde obtienen los recursos requeridos para completar su ciclo vital. Morfológicamente están bien adaptados a este tipo de vida, pues son alargados, aerodinámicos y afilados en ambos extremos. Miden de 8 a más de 50 μm [110].

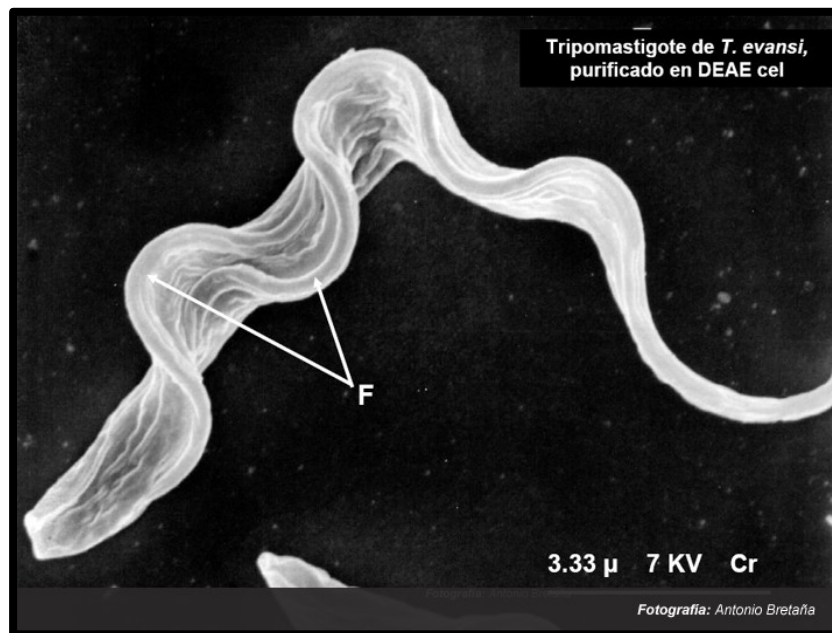


Figura 4. Morfología externa de *Trypanosoma* sp.: F. Flagelo

El protoplasma se compone de tres partes: una cubierta protectora externa denominada **membrana celular**, la cual es ondulante, contiene la mayor parte del **flagelo** sobre ella y, a su vez, encierra al **citoplasma**, donde se encuentran suspendidas las estructuras internas del parásito [110].

La estructura más notoria es el núcleo, que contiene el ácido desoxirribonucleico (ADN) y es el responsable de la transmisión de la información genética de una generación a otra. Seguido de éste, otro cuerpo bien definido es el kinetoplasto, que se encuentra hacia la terminación posterior del tripanosoma y se diferencia en el tamaño y la posición según la especie [110]. También contiene ADN y forma parte de la mitocondria que recorre la longitud total del cuerpo [92]. Tiene funciones importantes en la reproducción y el metabolismo, y se cree que es esencial en los tripanosomas transmitidos biológicamente [110]. No obstante, muchos tripanosomas en ausencia de vectores biológicos evolucionaron hacia diversas formas de transmisión, siendo la principal la de tipo mecánica, aunque también se conocen casos de transmisión oral y sexual. La reproducción, que es asexual y ocurre por fisión binaria longitudinal, se inicia en el kinetoplasto [92].

Adyacente al kinetoplasto se encuentra el blefaroplasto, también llamado cuerpo basal, que constituye el aparato neuromotor de donde emerge el axonema, que forma la estructura axial del flagelo, la cual se compone, a su vez, de nueve fibrillas periféricas y dos centrales, rodeadas por una vaina flagelar que se extiende hasta el extremo distal del axonema [92].

Trypanosoma (Trypanozoon) *evansi* (Steel, 1885), fue el primer tripanosoma patógeno descubierto, observado por Evans, en 1880, en sangre de caballos y

camellos que presentaban una condición patológica conocida como surra [53], que significa “podrido” en hindi [92]. En Venezuela fue observado por el Dr. Rafael Rangel en sangre de caballos afectados por una enfermedad denominada comúnmente derrengadera [74] y en aquel momento recibió el nombre de *T. venezuelense* Mesnil, 1910 [53, 74]. También conocida como mal de caderas, la tripanosomosis equina es una enfermedad que afecta principalmente a équidos de la familia Equidae.

Los caballos y asnos (*Equus caballus* y *E. asinus* Linnaeus, 1758), son animales que representan una pieza fundamental en el trabajo y manejo de una explotación pecuaria, por tanto a las pérdidas económicas mencionadas anteriormente se suma la disminución de horas laborales por jornada, atribuidas al mal estado físico y muerte de estos animales. Además de équidos, *T. evansi* tiene la capacidad de infectar un gran número de animales domésticos y silvestres, entre los que destacan perros (*Canis lupus familiaris* Linnaeus 1758), chigüires o capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766), murciélagos hematófagos (*Desmodus rotundus* Geoffroy, 1810) [53] y nectívoros (*Leptonycteris curasoae* Miller, 1900) [90], entre otros. Se ha reportado además en búfalos de agua (*Bubalus bubalis* Kerr, 1792), vacunos (*Bos taurus taurus* y *B.t. indicus* Linnaeus, 1758), cerdos (*Sus scrofa domestica* Linnaeus, 1758), ovejas (*Ovis* spp. Linnaeus, 1758), cabras (*Capra* spp. Linnaeus, 1758) [53], e inclusive humanos (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758) [60, 87].

Esta amplia gama de hospedadores actúan como reservorios, favoreciendo la estabilidad enzoótica del parásito.

Por otra parte, la tripanosomosis bovina, conocida comúnmente como secadera, huequera o cacho hueco [80], es una enfermedad parasitaria producida por *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* Ziemann, 1905, que afecta principalmente a bóvidos (Bovidae: Artiodactyla) rumiantes de rebaños vacunos, bufalinos, ovinos y caprinos. El primer reporte de este protozoario fue realizado por Ziemann en 1905, en rumiantes de Camerún [53], mientras que en el neotrópico aparece por primera vez en Guayana Francesa en 1919, siendo al año siguiente reportado en Venezuela por Tejera [80].

El diagnóstico de infecciones activas por tripanosomas, independientemente de la especie involucrada, se basa en técnicas parasitológicas de observación directa al microscopio óptico, tales como: observación de sangre fresca, técnica de microcentrifugación capilar (TMC), también conocida como técnica de Woo [113], frotis sanguíneo de gota gruesa y frotis de capa blanca, teñidos comúnmente con solución de Giemsa al 10% o Hemacolor® [92]. Estos métodos son ampliamente utilizados bajo condiciones de campo, a pesar de su bajo porcentaje de detección del parásito [43], al requerir de una infección activa al momento de la toma de muestra. Por otra parte, las pruebas de diagnóstico serológico, realizadas en laboratorio, aportan mejor información sobre la situación del rebaño, ya que

permiten detectar niveles de anticuerpos circulantes contra el parásito en el suero sanguíneo, indicativos de infección activa o reciente, como en el caso del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI), hemoaglutinación pasiva (HP), aglutinación capilar (AC), entre otras [83, 92].

El ELISA es un método para cuantificar un antígeno (Ag) inmovilizado en una superficie sólida utilizando un anticuerpo (Ac) específico con una enzima unida covalentemente. La cantidad de Ac que se une al Ag es proporcional a la cantidad de Ag presente, y se determina midiendo con espectrofotometría la conversión de un sustrato incoloro en un producto coloreado por la acción de la enzima unida al anticuerpo [1, 2]. Este es el principio general, sin embargo se han diseñado diversas modalidades de esta técnica, entre las se encuentra el ELISA indirecto, en el que se usa un antígeno conocido del patógeno a diagnosticar, el cual se une a las paredes de poliestireno de la placa de microtitulación, de estar presentes en la muestra anticuerpos séricos contra dicho antígeno ocurre la unión Ag-Ac, que es detectada por medio de un segundo anticuerpo, una antiglobulina específica de la especie involucrada, la cual está conjugada a una enzima. La adición del sustrato de la enzima causa un cambio de color proporcional a la cantidad del anticuerpo unido [106]. La figura 5 nos brinda una visión didáctica de lo que ocurre dentro de un pozo de una placa de microtitulación una vez finalizado el ELISA cuando la muestra resulta positiva.

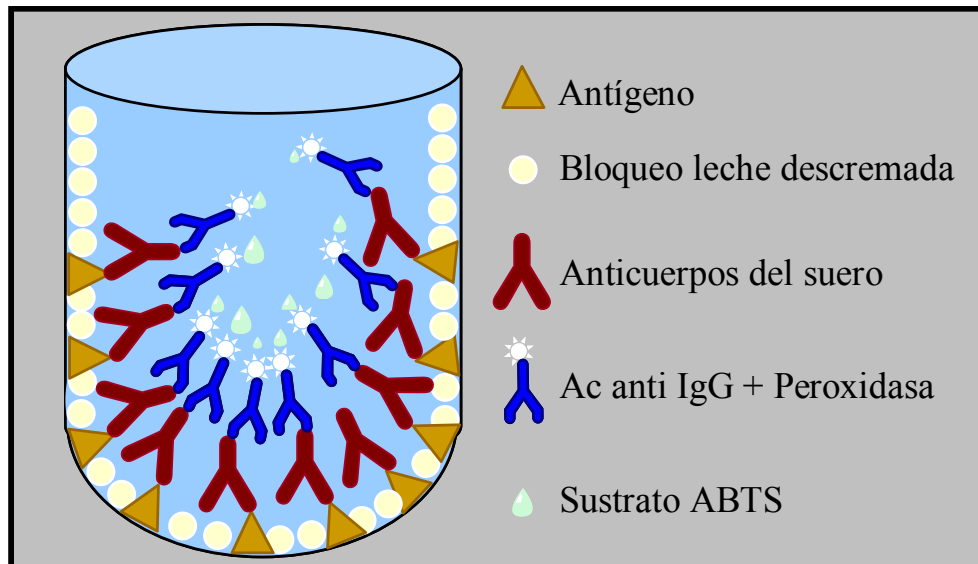


Figura 5. **ELISA indirecto para el diagnóstico positivo de *Trypanosoma* spp.**

Otras técnicas de diagnóstico que han ganado auge en las últimas décadas son aquellas que tienen por blanco la detección molecular del ADN del parásito, entre las que destaca la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), una técnica *in vitro* que simula el proceso de duplicación propio del ADN, dando como resultado múltiples copias de un fragmento específico de interés, llamado secuencia blanco. Para ello nos valemos de cambios sucesivos y controlados de temperatura y de la utilización de todos los componentes requeridos para que la duplicación se lleve a cabo, es decir, agua destilada y desionizada (H_2O_{dda}), cebadores (oligonucleótidos o primers), ADN molde (muestra), desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), ADN polimerasa termoresistente (enzima Taq polimerasa o TaqPol), tampón o amortiguadores de reacción. El proceso se realiza en tres etapas

que se repiten cíclicamente, éstas son: Desnaturalización, en la que se separan las dos hebras de ADN; hibridización, donde se alinean los cebadores (sentido y antisentido) delimitando el fragmento a amplificar; y elongación, es cuando actúa la TaqPol incorporando nucleótidos para formar las nuevas cadenas del fragmento de ADN de interés. Una vez obtenida la mezcla de reacción (MR) y colocada en tubos para PCR (200 µl) con cada una de las muestras más un blanco (MR sin ADN), el proceso se realiza de forma automatizada en un termociclador, el cual puede ser programado para que varíe las temperaturas a las que ocurren las tres etapas de la duplicación anteriormente mencionadas. Posteriormente las reacciones son sometidas a una corrida electroforética horizontal en gel de agarosa. La electroforesis se basa en la separación de biomoléculas, en este caso fragmentos de ADN, bajo la acción de un campo eléctrico, donde la velocidad de migración depende de la densidad de carga de la molécula (relación carga/peso), del voltaje aplicado y de la porosidad del gel de electroforesis [44].

Todas estas técnicas se aplican en nuestro país y han sido empleadas durante largo tiempo en el diagnóstico de tripanosomosis animal. A pesar que en el año 1971, en una breve comunicación inglesa se resalta el hecho de que en Venezuela no existían datos precisos de prevalencia, ni infraestructura para diagnosticar la enfermedad [18], hoy en día es, quizás, la patología animal provocada por hemoparásitos más ampliamente estudiada, sin embargo continúa siendo un

problema sanitario de relevancia, a pesar de la solidez de varios grupos de trabajo y laboratorios abocados a su investigación.

En 1980, una encuesta serológica realizada mediante HP y AC que abarcó rebaños bovinos ubicados en diferentes estados del país, mostró un índice de prevalencia de 25,5% (n=1884), indistintamente del grupo etario del rebaño y del tipo de explotación (leche o carne); siendo el estado Apure el de mayor prevalencia (39,3%, n=193) [108]. Posteriormente, el mismo grupo publicó datos obtenidos mediante AC para 735 muestras pertenecientes a cuatro fincas de estado Guárico, con una prevalencia de 9,6%, y refieren por primera vez que el patógeno se encuentra más comúnmente en adultos que en becerros [109]. En 1990, dan a conocer una seroprevalencia (SP) media nacional de 20,8%, ubicándose esta vez la mayor en la región central (33,5%) [107].

En 1991, en la localidad de Santa María de Ipire en el estado Guárico, se reportaron también prevalencias más altas en adultos (55%) que en animales jóvenes (13 a 28%), a través de IFI [76]. Para el siguiente año, en las regiones norcentro y sureste del estado Guárico, mediante IFI (n=1509), se reportó mayor prevalencia en época lluviosa (33,8%) que en sequía (3,63%), mayor en adultos (72,2%) que en animales de 0 a 12 meses (16,3%) y de 13 a 24 m (8,5%), y, finalmente mayor en hembras (87,56%) que en machos (12,44%) [100]. En la región nororiental de Falcón se realizó un estudio que abarcó 60 fincas de siete municipios (n=500) con una SP

media de 57,8% mediante IFI, donde la menor encontrada fue de 51,3% y la mayor 87,5% [32].

En 1998, en Valle de Aroa, estado Yaracuy, se reportó una SP de 38,2% en dos fincas (n=387), mediante IFI [86]; en 1999, de 42,3% en tres localidades del estado Bolívar (n=142), mediante ELISA [34]; en el 2000, se registraron SP de 25% y 50% respectivamente en dos fincas del estado Guárico, mediante IFI (n=88) [98].

En 2001, se reportó la mayor prevalencia obtenida en la historia del país empleando una técnica directa de diagnóstico, fue de 66,67% mediante TMC [79]. En este trabajo el mismo índice fue obtenido en tres estados simultáneamente, Bolívar (n=18), Carabobo (n=18) y Cojedes (n=12) y, a pesar del reducido número de muestras se considera un índice elevado dada la baja sensibilidad que tiene esta técnica.

En 2002, se reportan SP de 56,9% en época lluviosa y 45,7% en sequía, en los municipios Roscio y Ortiz del estado Guárico (n=193) mediante IFI [99]. En 2004, también en el estado Guárico, se obtuvo una SP de 27,08% (n=48) mediante ELISA, reportándose además coinfección en 11/13 de las muestras con *Anaplasma marginale* Theiler 1910, otro hemoparásito de relevada importancia pecuaria [33]; mientras que en Falcón, para el mismo año se reportaron SP de 7, 10, 38 y 46% en cuatro de diez fincas muestreadas en la población de Tucacas (n=347) [96]. Por otra

parte, en el municipio Mara del estado Zulia ocurrió un brote donde se alcanzó a diagnosticar positivamente el 77,7% de 450 animales, mediante frotis de capa blanca teñido con Giemsa 10%, en lo que se tiene como el mayor segundo índice de positivos con una técnica de observación directa [91].

En 2007, en el municipio Juan José Mora del estado Carabobo, se obtuvo una SP, mediante ELISA, de 39,5% (n=400) [48]. En el mismo año, en el estado Monagas se registró, por ELISA, 60% de SP en el noreste y 58% en el sur (n=151) [5]; y 50,5% un año después en otro estudio, también al sur ese estado (n=100) [42].

Dos trabajos que abarcaron varios estados del país fueron publicados en 2009, el primero mostró una SP media de 85,76% en 20 rebaños de cinco estados (n=790), siendo Guárico el que contó con el muestreo más amplio (12 fincas, n=529, SP=85,76%), seguido por Apure (3 fincas, n=83, SP=95,55%), Aragua (2 fincas, n=81, SP=65,17%), Barinas (2 fincas, n=50, SP=84,57%) y Cojedes (1 finca, n=40, SP=100%) [3]. El segundo trabajo tuvo una población muestral de 1.572 animales con SP media de 33,1%, dividida en cuatro regiones geográficas: los llanos 41,4% (n=982), centrooccidental 22,0% (n=304), sur de lago 20,5% (n=166) y andina 10% (n=120) [97].

Datos sobre prevalencia de tripanosomosis en otras especies diferentes a *Bos spp.* son escasos. Muestras tomadas en 1991, revelaron SP de 82,92% (n=115) y

14,08% (n=152) en dos fincas de producción de búfalos del oriente de Guárico, donde se reportó además una alta presencia de tabánidos [101, 102].

Más recientemente, se expusieron resultados obtenidos desde 2005 a 2013, de 4.989 muestras de sueros de vacunos (n=3.798), búfalos (n=437) y equinos (n=754) pertenecientes a 51 explotaciones pecuarias en 18 municipios de 11 estados; observándose un total de 2.689 animales positivos (53,9%), entre ellos 2.438 vacunos (64,2%), 92 búfalos (21,2%) y 159 equinos (21,1%). Se destacó el estado Apure por contar con el mayor número de muestras analizadas y debido a su gran importancia en el sector ganadero; adicionalmente fue el único estado en el que se colectaron muestras de las tres especies, encontrando seroprevalencias de 65,1% (2.159/3.319) en vacunos, 34,9% (15/43) en búfalos y 23,1% (60/260) en equinos [77].

Los signos clínicos que presentan los animales afectados por tripanosomosis son los característicos de cualquier enfermedad provocada por otros agentes hemotrópicos o de enfermedades que cursen con estados febriles intermitentes, decaimiento, inapetencia, pérdida de peso, infertilidad temporal, inflamación de los nódulos linfáticos y aumento de la secreción glandular (principalmente de las glándulas lagrimales), entre otros; lo que conlleva a una notoria disminución de la producción. Por lo tanto la experiencia y las pruebas diagnósticas son en extremo

importantes a la hora de determinar su presencia y establecer programas de tratamiento y control de la enfermedad.

El tratamiento curativo, en casos agudos y crónicos de la enfermedad, va dirigido a la eliminación del parásito, mediante la administración de drogas tripanocidas (diminaceno, quinapiramida y fenantridinas) y a dar soporte al animal afectado mediante agentes terapéuticos que produzcan un aumento del número de eritrocitos y/o de la concentración de hemoglobina en estas células (Ej. hierro y vitaminas del complejo B), fluidoterapia, agentes antipiréticos y buena alimentación. Por otra parte, cuando el patógeno produce casos de infección subaguda, manteniéndose de manera enzoótica en el rebaño, se suele implementar el uso de drogas tripanocidas de forma profiláctica, principalmente quinapiramida y fenantridinas. Sin embargo, su uso prolongado ha dado paso a la supervivencia de cepas resistentes, mientras que las susceptibles tienden a desaparecer [57, 80, 92]. Otras formas de control incluyen la cría de bovinos tripanotolerantes, que ha sido aplicada en África con algunos resultados favorables; y el control de vectores [80], que suele dar resultados positivos, pero no perdurables, además de ser comúnmente costoso.

De las drogas disponibles en el mercado farmacéutico, el clorhidrato de cloruro de isometamidium es un derivado de fenantridina, cuyo mecanismo de acción no se conoce en su totalidad, pero se cree que inhibe selectivamente la enzima topoisomerasa II del kinetoplasto [61], impidiendo el correcto desenrollamiento de

las hebras de ADN y provocando rupturas descontroladas de las mismas por aumento de la tensión. En estudios previos realizados en novillos, el isometamidium demostró tener acción tanto curativa, eliminando eficazmente los tripanosomas circulantes, como preventiva hasta 4 meses después de la aplicación intramuscular. Sin embargo, se recomienda reservar su uso sólo para tratamientos curativos en virtud de la rapidez con que se observa la aparición de cepas de *T. congolense* y *T. vivax* resistentes al fármaco [37].

V. METODOLOGÍA

1. Selección de la unidad de producción

La zona endémica fue seleccionada a través de un estudio previo donde se determinó una alta seroprevalencia de *Trypanosoma* spp. (74,59%) en tres fincas del Municipio Muñoz del estado Apure [83]. Adicional a la presencia de tripanosomas, el área de muestreo abarcó las siguientes características: Estacionalidad, altitud menor a 1.000 m s. n. m., presencia de vectores y hospederos domésticos (animales de producción).

La zona se compone de una gran llanura de sabanas inundables en época de lluvia, sin relieves significativos y con variaciones climáticas menores. Temperatura entre

23 y 34°C y altitud entre 0 y 90 m s. n. m. Según la clasificación de Holdridge, corresponde a un clima de Bosque Seco Tropical [54], donde el volumen promedio anual de evaporación es de 2.237,9 mm [4] y pluviosidad de 1.258 mm [45], que se manifiesta con un período de lluvia que inicia en mayo y culmina en octubre y un período de sequía comprendido entre noviembre y abril. Cabe destacar que esta zona no escapa al fenómeno climático mundial, por lo que en los últimos años se han registrado cambios importantes en la duración e intensidad de las estaciones.

2. Muestreo entomológico

La unidad de producción cuenta con una superficie de 39.623,5 hectáreas, mientras que el potrero donde se realizó el muestreo tiene una superficie de 1.409 ha, y una carga animal de 522 novillas, 158 mautas de búfalo, 131 mautas de búfalo, invariable durante el tiempo de estudio, y aproximadamente, 12 caballos que se encontraban en constante rotación por ser atajos de trabajo.

Los muestreos se llevaron a cabo durante tres (3) días al mes por trece (13) meses, desde noviembre 2009 hasta noviembre 2010, abarcando de esta manera ambos períodos estacionales (lluvia y sequía) y además tres transiciones estacionales (lluvia-sequía noviembre-2009, sequía-lluvia abril-2010 y lluvia-sequía noviembre-2010).

Para la captura de los tabánidos se emplearon seis (6) trampas Canopy [55], distribuidas aleatoriamente en un área de 9 Km², flanqueada por zonas de bosque de galería y sabana, colocadas a una distancia aproximada de 25 m entre ellas (Fig. 6). Las coordenadas del centro relativo del área fueron 7°49'03"N 69°17'31"O y la altitud 81 m s. n. m.

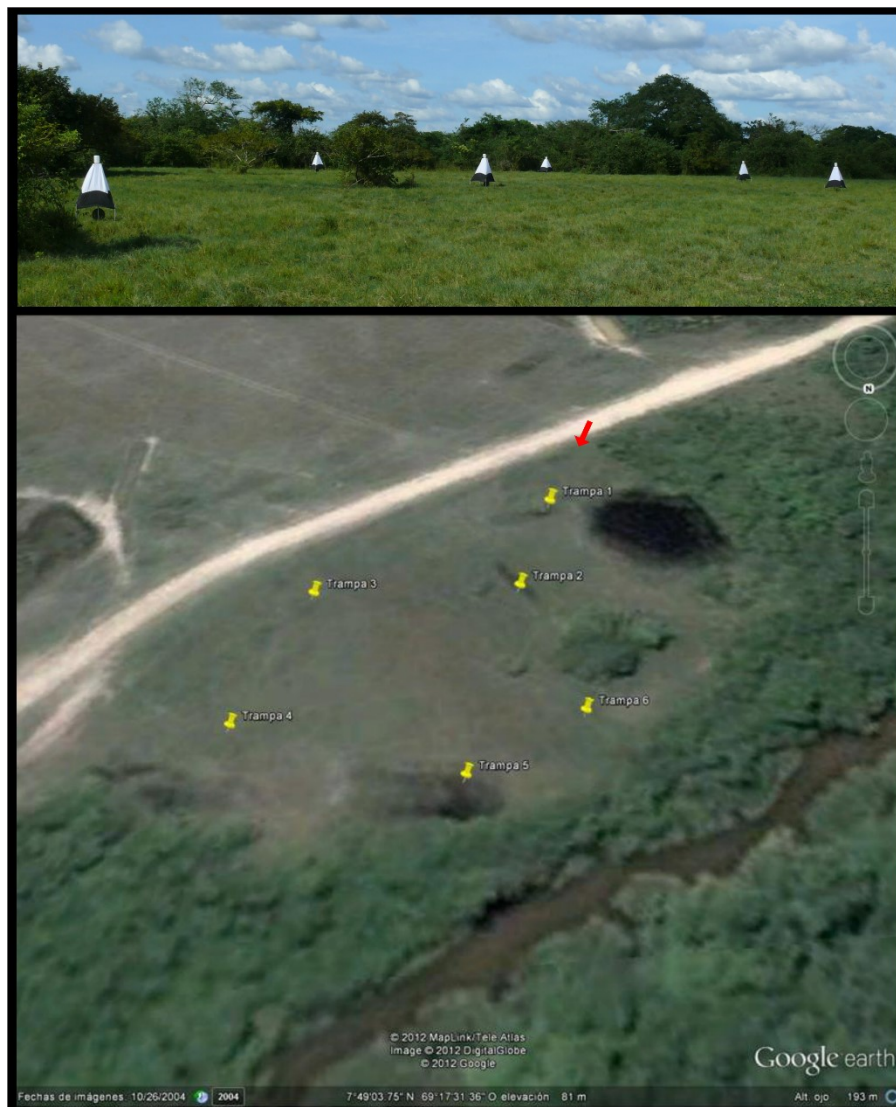


Figura 6. **Distribución aleatoria de las trampas:** La flecha roja refiere el ángulo de la fotografía superior y los puntos amarillos indican la ubicación relativa de cada trampa y su número asignado.

Las trampas de tipo Canopy cuentan con la ventaja de ser fáciles de armar en corto tiempo y, debido a que poseen soportes propios, pueden colocarse prácticamente en cualquier terreno, sea abierto o cerrado. Su eficiencia en la captura de hembras de tabánidos ha sido comparada con la de trampas Malaise sin cebo, sin encontrarse diferencias significativas [81].

Como atrayente visual se utilizó un círculo de tela negra de 45 cm de diámetro, con circunferencia de alambre, pendiente del asta central de la trampa (Fig. 7). Dicho círculo sustituye la pelota plástica inflable negra utilizada repetidamente en ensayos similares [51, 82, 104].



Figura 7. **Atrayente visual en el interior de la trampa Canopy**

Se empleó 1-Octen-3-ol, 98% (Aldrich Chemical Company, Wisconsin, USA) como atrayente químico. Este alcohol secundario, también conocido como octenol o alcohol de hongos, ha sido ampliamente utilizado como cebo en diferentes tipos de

trampas con resultados exitosos. En 1989 fueron reportados aumentos significativos en la cantidad de tábanos capturados en comparación con los controles sin octenol [41]. Más recientemente se ha reportado que trampas Canopy con octenol capturan ocho veces más tabánidos que las trampas sin cebo [62]. En este ámbito también ha sido recomendado el hielo seco como fuente de CO₂, cuyo empleo ha demostrado aún mejores resultados que el octenol [111], sin embargo no se consideró apropiado su empleo en este estudio por razones de logística y costo. Se colocó 1 ml de octenol en un frasco abierto (Ø 1,5 cm), atado al tubo central de cada trampa. La boca del frasco se protegió con malla de gasa.

Los tabánidos fueron retirados vivos de las trampas (Fig. 8) en tres horarios durante el día: 07:00 (m), 12:30 (md) y 17:30 (t). Las moscas fueron trasladadas al laboratorio de campo para su procesamiento.



Figura 8. Retiro de los tabánidos colectados en las trampas

Los datos sobre los factores climáticos estacionales, como pluviosidad mensual acumulada medida en milímetros de lluvia (mm), temperatura máxima y temperatura mínima mensuales medidas en grados centígrados (°C) fueron recabados en el propio hato, por el personal del mismo.

3. Identificación taxonómica

Una vez trasladados al laboratorio de campo los especímenes de la familia Tabanidae capturados fueron clasificados por similitud morfológica, a nivel de género y posible especie, estando aún con vida, posteriormente se sometieron a bajas temperaturas (-20 °C) durante 30 minutos. Representantes de cada especie fueron montados, fotografiados, etiquetados y almacenados como colección de referencia, y finalmente identificados a nivel de género, subgénero y especie, mediante el empleo de claves [8, 19, 35] bajo lupa estereoscópica PZMTIII (World Precision Instruments, Inc. Florida, USA); mientras que los ejemplares restantes fueron diseccionados y conservados para estudios moleculares.

Adicionalmente, se realizaron estudios comparativos entre los especímenes colectados y los ejemplares de la colección del Museo del Instituto de Zoología Agrícola perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de

Venezuela (MIZA-FAGRO-UCV). En dicho museo se conserva la colección generada en este trabajo.

Algunos ejemplares de referencia de cada especie colectada fueron enviados en calidad de préstamo a la Colección de Invertebrados del Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA-Manaus-Brasil), para confirmar las identificaciones taxonómicas mediante estudio comparativo con los ejemplares tipo depositados en dicha colección, bajo la dirección y colaboración su curador, Dr. Augusto Henriques.

4. Análisis estadísticos

Se elaboraron cinco matrices de orden $n \times p$, la cual es una ordenación rectangular de elementos dispuestos en n filas y p columnas; donde n es el número total de individuos colectados para todas las matrices ($n=9.133$), mientras que la variable p fue diferente para cada matriz, siendo $p_1=10$, en relación a las 10 especies colectadas (**tpung**=*Tabanus pungens*, **tclar**=*T. claripennis*, **tocc**=*T. occidentalis*, **cuni**=*Cryptotylus unicolor*, **lcra**=*Lepiselaga crassipes*, **tlut**=*T. lutzi*, **tsor**=*T. sorbillans*, **tolce**=*T. olivaceiventris*, **timp**=*T. importunus*, **chry**=*Chrysops* sp.); $p_2=13$, en relación al mes de colecta que va de **nov-09** a **nov-10**, $p_3=6$, representando cada una de las trampas Canopy utilizadas de **T1** a **T6** (ver su distribución en la figura 6), $p_4=3$, en relación a los datos ambientales de temperatura

máxima y mínima (**T°Max** y **T°Min**) y pluviosidad en mm de lámina de agua (**Lluvia**) y, por último, $p_5=3$, relacionado al horario de colecta (**m**=7.00, **md**=12.30, **t**=17.30).

En base a ellas se realizó análisis de componentes principales (ACP), con la finalidad estudiar la variabilidad de la composición poblacional de los tabánidos por trampa, mes y hora del día. Se realizó análisis de coinerencia [25, 26, 29] para encontrar la estructura común por mes de los dos grupos de datos (ambientales y poblacionales). Se evaluó mediante STATIS [56] la configuración compromiso de los tabánidos y la similitud del comportamiento poblacional por mes y por trampa. Para estos análisis se utilizó el paquete ADE-4 de la R Software® [17, 27, 28].

5. Disección de tracto digestivo

Tal como se mencionó, aquellos ejemplares vivos, no incluidos en la colección de referencia fueron separados por especie, fotografiados y sometidos a disección. Patas y alas se removieron del insecto para facilitar el procedimiento, mientras que proboscis, glándulas salivales e intestino de los ejemplares alimentados, fueron separados del resto del insecto, colocados en un portaobjetos y resuspendidos en 20 μ l de solución tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 (20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM Na_2HPO_4 y 150 mM NaCl). Cada muestra se colocó en dos tipos de papel de filtro: QIAcard FTA® (FlindersTechnology Associates) (QIAGEN® California, USA) y papel

de filtro convencional Whatman® No 42 (Whatman International Ltd. Maidstone, England), para su transporte y conservación del ADN [30, 47, 69].

Para evitar contaminación entre las muestras, cada una se diseccionó individualmente y los instrumentos de disección fueron esterilizados mediante inmersión en hipoclorito de sodio al 4,25% (Opin C.A. Caracas, Venezuela) durante dos minutos y lavados dos veces, primero con agua destilada y luego con solución salina isotónica (0,9%, p/v NaCl) [68].

6. Diagnóstico molecular de tripanosoma en tabánidos alimentados:

6.1. Alimentación experimental de tabánidos con sangre de ratas sanas e infectadas con tripanosoma.

En campo, se tomaron al azar algunos tábanos capturados en las trampas, los cuales a simple vista no se notaban alimentados recientemente. Ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) de la línea *Sprague Dawley*, hembras entre 250 y 300 g de peso vivo, fueron inoculadas con el aislado criopreservado de *Trypanosoma evansi* denominado TEVA1 [75], el cual fue recientemente renombrado e identificado molecularmente como *T. equiperdum* Døflein, 1901 [85]. Se conoce que estos dos parásitos son muy similares morfológicamente [53], pero difieren en la forma de transmisión conocida y en la patología que generan, ya que

T. equiperdum causa una enfermedad, llamada durina, que afecta équidos y se transmite por vía venérea [53]; sin embargo, no se conocen estudios que permitan descartar la transmisión metaxénica o iatrogénica de este tripanosoma, tal como ocurre con el resto del subgénero *Trypanozoon*.

Las ratas se inocularon con, aproximadamente, $1,8 \times 10^6$ parásitos totales por vía intraperitoneal. La parasitemia fue monitoreada durante los siguientes días y al alcanzar umbrales de 7×10^6 parásitos por mililitro las ratas fueron anestesiadas con tiopental sódico 500 mg (dosis 5 mg/Kg de peso vivo) y expuestas a la picadura de los tabánidos en un dispositivo adaptado para tal fin (Ver Anexo 1), durante aproximadamente una hora por experimento, en función de la duración de la anestesia (Fig. 9). A manera de control negativo un grupo de tabánidos fue alimentado con una rata sana (no inoculada). Todos los tabánidos, previa identificación taxonómica, fueron diseccionados y su muestra conservada tal como se explicó en la sección anterior sobre disección de tracto digestivo. Adicionalmente, se dispuso de una muestra como control positivo obtenida directamente de sangre de rata infectada, no conservada en papel.



Figura 9. **Dispositivo adaptado para la alimentación experimental de tabánidos**

6.2. Estandarización de la técnica de PCR empleando muestras de tábanos alimentados experimentalmente con ratas

Para la estandarización de la PCR, el ADN de las muestras de tracto digestivo de tabánidos y la muestra de sangre de rata fue obtenido mediante la técnica de descrita por Bereczky y col. [12], y su concentración cuantificada usando un espectrofotómetro GenQuant Pro (Amersham Biosciences. Buckinghamshire, UK) y ajustada a 27,7 $\mu\text{g/ml}$, a manera de igualar todas las muestras a la de la menor concentración de ADN obtenida. Con la finalidad de establecer el umbral mínimo de reconocimiento de la presencia de *Trypanosoma evansi* en las muestras, se utilizaron las siguientes concentraciones de nanogramos totales de ADN en la mezcla para PCR: 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 5 y 2,5. Se fueron variando las condiciones de la PCR a fin de determinar las concentraciones óptimas de los

componentes y las condiciones de temperatura y tiempo del programa en el termociclador, para los procesos de desnaturalización, alineación y extensión de la secuencia blanco, empleando los oligonucleótidos ITS1CF (Sentido) 5'-CCGGAAGTTCACCGATATTG-3' y ITS1BR (Antisentido) 5'-TTGCTGCGTTCTTCAACGAA-3', que amplifican una región de aproximadamente 480 pares de bases (pb) de la secuencia de espaciadores de transcripción interna (ITS) del ADN ribosómico de *T. evansi* [67].

Todos los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis horizontal en geles de agarosa empleando Agarose D-1 LE GQT (Scientific Trade Corp, Miami, USA) al 1,5% en solución Tris-Acetato-EDTA (TAE buffer) 1X (Promega Corporation, Wisconsin, USA) y Sybr®Safe 1X (Invitrogen, Oregon, USA), durante 50 minutos a 120 voltios y 400 miliamperios. Se utilizó como referencia de peso molecular el marcador 50pb DNA step ladder (Sigma-Aldrich, Misuri, USA). Posteriormente los geles fueron revelados mediante el fotodocumentador de geles Fotodyne 60 2105 (Fotodyne Incorporated, Wisconsin, USA) y las imágenes digitales captadas por el programa FOTO/Analyst® PCimage (Versión 5.00. Fotodyne Incorporated, Wisconsin, USA).

6.3. Diagnóstico de *T. evansi* y *T. vivax* en muestras de tabánidos alimentados en campo.

Las muestras de tabánidos alimentados naturalmente fueron sometidas a extracción de ADN empleando igualmente el método de Berezky y col. [12]. Las concentraciones obtenidas fueron determinadas usando un micro-espectrofotómetro NAS99 (ACTGene, New Jersey, USA) y registradas bajo la versión 1.0.0.3 del programa del mismo nombre. Los promedios de cada papel de filtro fueron comparados estadísticamente mediante la prueba t de Student para datos independientes.

Para la PCR se emplearon concentraciones de AND por muestra entre 200 y 75 ng [78], bajo las siguientes condiciones:

Componente	Stock	Concentración Final
Tampón Taq	10X	1X
MgCl ₂	50 mM	2 mM
dNTP's	40 mM	800 uM
ITS1BR	10 uM	0,2 uM
ITS1CF	10 uM	0,2 uM
Taq Pol	5 U/ul	0,5 U/reacción
H ₂ O		Hasta completar 15 ul/reacción

Se emplearon indistintamente dos termocicladores, Mastercycler personal y Mastercycler egradientS (Eppendorf, AG, Hamburgo, Alemania), dependiendo de su disponibilidad en el laboratorio. El programa inició con un ciclo de 94°C/5 min,

seguido de 38 ciclos de 94°C/40 seg, 58°C/40 seg y 72°C/90 seg, para finalizar con un ciclo de 72°C/5 min y temperatura de mantenimiento de 21°C.

Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa y revelados tal como se explicó en la sección anterior. La aparición de una banda del tamaño esperado por muestra indica su positividad.

Los cebadores ITS1BR e ITS1CF también amplifican un segmento de, aproximadamente, 200 pb de *T. vivax* [67], y cabe destacar que estos cebadores no son capaces de distinguir entre *T. evansi* y *T. equiperdum* mediante el tamaño del producto, por lo que para diferenciarlos se realizaron algunos PCR adicionales empleando los cebadores descritos recientemente por Sánchez y col. para los genes del maxicírculo citocromo b (Maxi Cyt 1 y Maxi Cyt 1.1) y citocromo oxidasa (Maxi 0.2 – Maxi 0.1) [85], entendiéndose que de tratarse de *T. evansi* no se espera amplificación alguna, mientras que muestras con un amplicón de aproximadamente 599 pb para el primer juego de cebadores y de 626 pb para el segundo, pueden considerarse positivas para *T. equiperdum*.

7. Determinación molecular de la fuente de alimentación de tabánidos:

Con la finalidad de asociar a los animales de producción (bóvidos y équidos), animales domésticos (perros y gatos), animales silvestres (chigüires, aves, reptiles,

entre otros) y humanos, como fuentes de alimentación de los tabánidos capturados, las muestras obtenidas fueron sometidas a PCR empleando los cebadores específicos Cyt b1 (Sentido) **5'-CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'** y Cyt b2 (Antisentido) **5'-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'** [65, 93], que amplifican secuencias de 359 pb del citocromo b de vertebrados.

La amplificación de los productos fue verificada en geles de agarosa al 1,5%, los amplicones obtenidos fueron purificados empleando el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega Corporation, Wisconsin, USA), y enviados para su secuenciación a Macrogen, Seoul, Korea.

Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.2.5) [49], comparadas con la base de datos no redundante del GenBank® [11], la identificación de las especies se realizó en base al porcentaje de identidad, que es el grado de invariabilidad entre dos secuencias, empleando BLAST®n (versión 2.2.32), en inglés Basic Local Alignment Search Tool [115]. Adicionalmente, para cada especie encontrada se realizaron alineamientos de las secuencias obtenidas con su secuencia homóloga y otras disponibles descargadas del GenBank, empleando la herramienta ClustalW multiple alignment [103], incluida en BioEdit.

8. Muestreo de los animales de producción

El grupo de bovinos seleccionado estuvo conformado por la totalidad de novillas del hato (n=513), considerando primordialmente su ubicación, en el mismo potrero donde se realizó la colecta de los tabánidos y donde permanecieron sin rotación durante todo el tiempo del estudio.

Empleando agujas 21G x 1 1/2" y tubos Vacutainer™ sin anticoagulante, las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción coccígea (Fig. 10), en cuatro momentos durante el estudio: diciembre del 2009, marzo, junio y septiembre del 2010. Se colectaron adicionalmente muestras en tubos Vacutainer™ con anticoagulante para la realización de extendidos sanguíneos y microcentrifugación capilar (aproximadamente el 10% de las novillas de cada muestreo). Las muestras de sangre se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas, se centrifugaron por espacio de 5 minutos a 5.000 rpm y los sueros obtenidos se transvasaron a tubos Eppendorf® con capacidad para 1,5 ml, se trasladaron refrigerados en cava con hielo hasta el laboratorio donde se mantuvieron a -20°C en un congelador vertical (Cool-Lab™, Lab-Line Instruments, Inc., Illinois, EUA) hasta la realización del ELISAI.



Figura 10. Toma de muestra sanguínea mediante punción coccígea

9. Aplicación de tratamiento tripanocida a los animales de producción y diagnóstico serológico de *Trypanosoma* spp mediante ELISAI

Todas las novillas fueron tratadas una semana antes de la primera toma de muestra (diciembre-2009) con 1 mg de clorhidrato de cloruro de isometamidium (solución inyectable al 2%) por kilogramo de peso vivo; debido a manejo de la unidad de producción no se estableció un grupo de animales control (no tratado). La aplicación anual de este tratamiento es una medida profiláctica que forma parte del programa sanitario del hato, la cual se ha empleado durante 5 años, con reportes favorables de aumento en la productividad de las novillas.

El antígeno a emplear se obtuvo de extracto purificado de *Trypanosoma evansi*, expandido en ratas Sprague Dawley, según el método descrito por Perrone [74]. Las condiciones para la realización del ELISA indirecto se estandarizaron como sigue: 1.000 ng totales de antígeno por cada 100 μ l (10 ng/ μ l), diluido en solución tampón carbonato bicarbonato 0,05 M pH 9,6 (BCB). Solución de bloqueo a base de leche descremada en polvo diluida al 5% en solución tampón fosfato salino 0,2 M pH 7,2 (PBS). Dilución 1:100 de cada suero problema y controles positivos y negativos en PBS y Tween 20 al 0,1%. Dilución 1:10.000 del anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de bovino conjugado a peroxidasa (anti-bovine IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA) y 30 minutos de exposición al cromógeno revelador 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) al 2% (ABTS, Sigma), en solución tampón citrato 0,05 M pH 4 y peróxido de hidrógeno al 0,5%, como sustrato de la enzima peroxidada.

Fueron utilizados dos sueros positivos y tres sueros negativos, por duplicado en cada placa, tomados al azar de una seroteca constituida por muestras de bovinos colectadas en diversas zonas del país, probadas previamente mediante la misma técnica de ELISA y confirmadas por western blot.

Para los ensayos, 100 μ l del antígeno fue agregado a cada pozo de placas de polivinilo (Immunolon® de 96 pozos, fondo U), exceptuando cuatro pozos por placa

destinados a funcionar como blancos (sin antígeno) y dos para control del BCB (suero de bovino diluido 1:100 en BCB); cada placa se incubó en cámara húmeda por 12 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados con solución de cloruro de sodio 1,5M y Tween 20 al 1%. Se agregaron 200 µl de solución de bloqueo, se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora, luego de la cual se descartó el contenido por inversión, sin lavar la placa. Se agregaron 100 µl de cada suero problema y controles, diluidos previamente, se incubó bajo las mismas condiciones y se lavó 3 veces. Se agregaron 100 µl del anticuerpo secundario, se incubó y lavó de igual forma. Se agregaron 100 µl de la solución cromógeno-sustrato y se incubó durante 30 min. en agitación suave, a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la densidad óptica a una longitud de 405 nm, en un espectrofotómetro Tecan Sunrise-Basic (Grödig, Austria).

Para el análisis de los resultados, los valores de los controles blancos obtenidos en cada placa fueron promediados y restados al resto de los valores. Los puntos de corte (PC) para determinar la positividad o negatividad de cada muestra se establecieron calculando el promedio de los controles negativos más tres desviaciones estándar [83]. La prevalencia relativa se expresó en base al porcentaje ajustado de individuos positivos y negativos para cada muestreo y se analizó empleando el programa estadístico MedCalc mediante pruebas de chi cuadrado con intervalo de confianza de 95%.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Listado de especies de tabánidos y abundancia

Durante el período de colecta establecido de noviembre-2009 a noviembre-2010 fueron colectados en las trampas Canopy un total de 9.133 especímenes hembra, pertenecientes a 10 especies (Fig. 11) distribuidas en 2 subfamilias (Chrysopsinae y Tabaninae), 3 tribus (Chrysopsini, Diachlorini y Tabanini) y 4 géneros (*Chrysops*, *Cryptotylus*, *Lepiselaga* y *Tabanus*). Adicionalmente, se colectaron manualmente dos ejemplares hembra en la zona peri-domiciliar, los cuales se agregaron a la colección entomológica, más no se tomaron en cuenta para los estudios de estacionalidad. La figura 11 muestra la abundancia relativa total registrada por especie y permite apreciar que *T. pungens* fue la especie más abundante en la zona (AR=83,75%) durante todo el período del estudio.

En la tabla I se puede apreciar que esta especie fue la más abundante en cada una de las capturas individuales exceptuando los meses de diciembre-2009 y enero-2010, en los que *T. claripennis* le superó (210 vs. 276 = 39,85% vs. 51,88% y 19 vs. 58 = 22,89% vs. 69,88%, respectivamente); y mayo-2010 donde fueron más abundantes *Cryptotylus unicolor* (39 vs. 114 = 15,73% vs. 45,97%) y *T. lutzii* (39 vs. 43 = 15,73% vs. 17,34%).

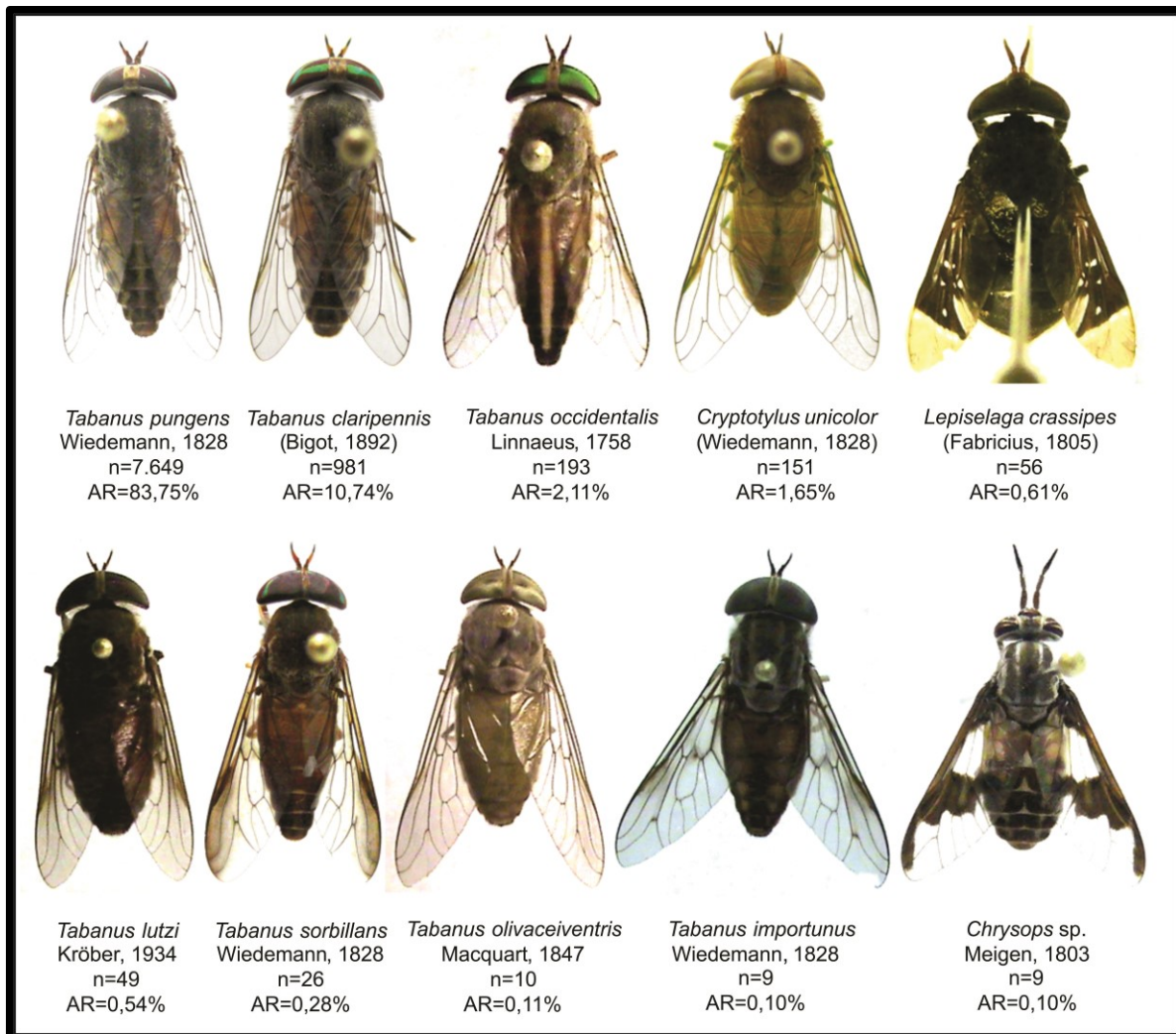


Figura 11. **Especies de tabánidos colectados:** se muestra el número de ejemplares capturados por especie y su abundancia relativa de noviembre-2009 a noviembre-2010.

Tabla I. **Número de ejemplares capturados por especie y por mes de colecta:** Solo incluye ejemplares hembras. Se muestran, adicionalmente, los datos de pluviosidad medidos por el personal del hato

Número de especies	Mes de colecta	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Tabanus claripennis</i>	<i>Tabanus occidentalis</i>	<i>Cryptotylus unicolor</i>	<i>Lepiselaga crassipes</i>	<i>Tabanus lutzi</i>	<i>Tabanus sorbillans</i>	<i>Tabanus olivaceiventris</i>	<i>Tabanus importunus</i>	<i>Chrysops sp.</i>	Total por mes	Pluviosidad (mm)
6	nov-09	117	108	3	0	1	0	12	2	0	0	243	0
6	dec-09	212	276	39	0	3	0	1	1	0	0	532	0
4	jan-10	19	58	5	0	1	0	0	0	0	0	83	0
5	feb-10	21	12	1	1	1	0	0	0	0	0	36	0
3	mar-10	27	3	0	0	0	0	0	0	2	0	32	0
6	apr-10	87	23	1	0	9	0	0	2	3	0	125	108
10	may-10	39	11	9	114	16	43	2	2	4	8	248	47
7	jun-10	41	2	13	28	4	4	3	0	0	0	95	149
8	jul-10	18	1	5	1	8	2	1	0	0	1	37	529
5	aug-10	129	19	9	6	8	0	0	0	0	0	171	308
6	sep-10	933	65	17	1	1	0	1	0	0	0	1.018	309
6	oct-10	3.502	210	31	0	3	0	6	3	0	0	3.755	85
4	nov-10	2.504	193	60	0	1	0	0	0	0	0	2.758	91
Total por especie		7.649	981	193	151	56	49	26	10	9	9	9.133	

Sólo en tres de los trece meses totales de muestreo (noviembre-2009, marzo y noviembre-2010), se colectaron especímenes macho: nueve individuos de la especie *Tabanus pungens* y dos *T. nebulosus*, para un total de 11 ejemplares pertenecientes al género *Tabanus*.

El listado de especies se presenta en orden alfabético y, jerárquicamente, los renglones taxonómicos subfamilia, tribu, género y especie. Adicionalmente, información sobre la localidad, fecha de colecta seguida del número de ejemplares capturados entre paréntesis, nombre del colector (Col.), método de colecta, nombre del taxónomo que determinó la especie de los mismos (Det.) y, por último, la cantidad y ubicación de los individuos por especie que conforman la colección de referencia generada, la cual comprende un total de 190 especímenes depositados en la colección entomológica del MIZA (Fig 12) y 14 individuos prestados a la colección del INPA-Manaus:

Subfamilia CHRYSOPSINAE
Tribu Chrysopsini
Género *Chrysops* Meigen
Chrysops spp.

10 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 4.v.2010 (2); 6.v.2010 (6); 28.vi.2010 (1), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A.L. Henríques y A. Rangel-Rivas. 2.vi.2010 (1) Col. A. Rangel-Rivas,

colecta manual. Det. A.L. Henríques y A. Rangel-Rivas. 8 depositados en MIZA y 2 prestados a INPA



Figura 12. Colección entomológica generada, depositada en MIZA

Subfamilia TABANINAE
 Tribu Diachlorini
 Género *Cryptotylus* Lutz
Cryptotylus unicolor (Wiedemann, 1828)

151 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m.,
 9.ii.2010 (1); 4-6.v.2010 (114); 1-3.vi.2010 (28); 28.vi.2010 (1); 25.vii.2010 (2);
 26.vii.2010 (4); 7.ix.2010 (1), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det.
 A. Rangel-Rivas. 13 depositados en MIZA.

Género *Lepiselaga* Macquart
Lepiselaga crassipes (Fabricius, 1805)

56 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m.,
 28.x.2009 (1); 1.xii.2009 (1); 3.xii.2009 (2); 15.i.2010 (1); 8.ii.2010 (1); 7.iv.2010 (1);
 8.iv.2010 (4); 9.iv.2010 (4); 4-6.v.2010 (16); 1.vi.2010 (3); 2.vi.2010 (1); 28.vi.2010
 (5); 29.vi.2010 (3); 25.vii.2010 (2); 26.vii.2010 (6); 7.ix.2010 (1); 5-7.x.2010 (3);
 16.xi.2010 (1), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-
 Rivas. 16 depositados en MIZA.

Tribu Tabanini
 Género *Tabanus* Linnaeus
Tabanus claripennis (Bigot, 1892)

981 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m.,
 28-30.x.2009 (108); 1-3.xii.2009 (276); 13-15.i.2010 (58); 8-10.ii.2010 (12);
 11.iii.2010 (3); 7-9.iv.2010 (23); 4-6.v.2010 (11); 3.vi.2010 (2); 28.vi.2010 (1); 25-
 27.vii.2010 (19); 7-9.ix.2010 (65); 5-7.x.2010 (210); 16-18.xi.2010 (193), Col. A.
 Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-Rivas. 33 depositados
 en MIZA.

Tabanus importunus Wiedemann, 1828

10 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m.,
 9.iii.2010 (2); 7-9.iv.2010 (3); 4.v.2010 (1); 6.v.2010 (3), Col. A. Rangel-Rivas,

trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-Rivas. 10.ii.2010 (1) Col. A. Rangel-Rivas, colecta manual. Det. A. Rangel-Rivas. 10 depositados en MIZA.

Tabanus lutzi Kröber, 1930

49 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 4-6.v.2010 (43); 2.vi.2010 (3); 3.vi.2010 (1); 29.vi.2010 (2), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-Rivas. 20 depositados en MIZA.

Tabanus nebulosus DeGeer, 1776

2 ♂♂ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 9-11.iii.2010 (2). Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A.L. Henríques. 2 prestados a INPA.

Tabanus occidentalis Linnaeus, 1758

193 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 29.x.2009 (3); 1-3.xii.2009 (39); 13.i.2010 (3); 14.i.2010 (2); 8.ii.2010 (1); 9.iv.2010 (1); 4.v.2010 (4); 5.v.2010 (2); 6.v.2010 (3); 1-3.vi.2010 (13); 28.vi.2010 (3); 29.vi.2010 (2); 25.vii.2010 (3); 26.vii.2010 (6); 7-9.ix.2010 (17); 5-7.x.2010 (31); 16-18.xi.2010 (60), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-Rivas. 29 depositados en MIZA y 1 prestado a INPA.

Tabanus olivaceiventris Macquart, 1847

10 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 29.x.2009 (2); 1.xii.2009 (1); 8.iv.2010 (2); 4.v.2010 (1); 6.v.2010 (1); 6.x.2010 (1); 7.x.2010 (2), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-Rivas. 7 depositados en MIZA.

Tabanus pungens Wiedemann, 1828

7.649 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 28-30.x.2009 (117); 1-3.xii.2009 (212); 13-15.i.2010 (19); 8-10.ii.2010 (21); 9-11.iii.2010 (27); 7-9.iv.2010 (87); 4-6.v.2010 (39); 1-3.vi.2010 (41); 28.vi.2010 (8); 29.vi.2010 (10); 25-27.vii.2010 (129); 7-9.ix.2010 (933); 5-7.x.2010 (3502); 16-18.xi.2010 (2504), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-Rivas. 43 depositados en MIZA.

9 ♂♂ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 27-30.x.2009 (7); 9.iii.2010 (1); 16.xi.2010 (1), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A.L. Henríques y A. Rangel-Rivas. 9 prestados a INPA.

Tabanus sorbillans Wiedemann, 1828

26 ♀♀ Venezuela, Apure, Municipio Muñoz, 7°49'03"N 69°17'31"O, 81 m s. n. m., 28-30.x.2009 (12); 2.xii.2009 (1); 4.v.2010 (1); 5.v.2010 (1); 1.vi.2010 (2); 3.vi.2010

(1); 29.vi.2010 (1); 9.ix.2010 (1); 6.x.2010 (3); 7.x.2010 (3), Col. A. Rangel-Rivas, trampa Canopy con octenol. Det. A. Rangel-Rivas. 11 depositados en MIZA.

2. Distribución estacional de las especies de tabánidos para la zona en estudio

Durante el período comprendido entre octubre-2009 a diciembre-2010, un mes antes y un mes después del inicio y final de este estudio respectivamente, la temperatura mínima registrada fue 21°C en diciembre-2010 con un promedio de 22,4°C; y la temperatura máxima (37°C) fue registrada en enero-2010 con un promedio de 34,1°C. En el mismo período la pluviosidad acumulada fue 1.808 mm, con un intervalo de absoluta sequía (0 mm) de noviembre-2009 a marzo-2010 y un pico máximo (529 mm) en julio-2010. (Datos registrados en el ható)

A lo largo de los 13 meses de colectas sucesivas, se observó que el período de mayor actividad de estos insectos para la zona en estudio se encuentra prácticamente restringido a tres meses del año (octubre a diciembre) posterior a la ocurrencia de la transición lluvia-sequía, prolongándose durante los dos primeros meses de sequía (noviembre y diciembre) y reduciéndose drásticamente entre enero y agosto, meses en que la sequía y la lluvia contrastan visiblemente, y aumentando de forma cíclica durante la transición lluvia-sequía del año siguiente. A pesar de la notoria fluctuación en la abundancia, los tabánidos presentaron actividad durante todo el año (Fig. 13). Esta prolongada presencia de vectores junto con los

resultados moleculares obtenidos (ver sección 4.3 y 5) sugiere que los tabánidos participan en la transmisión mecánica de tripanosomas en el área de estudio, tal como ha sido demostrado previamente en estudios sobre transmisión mecánica [39, 63].

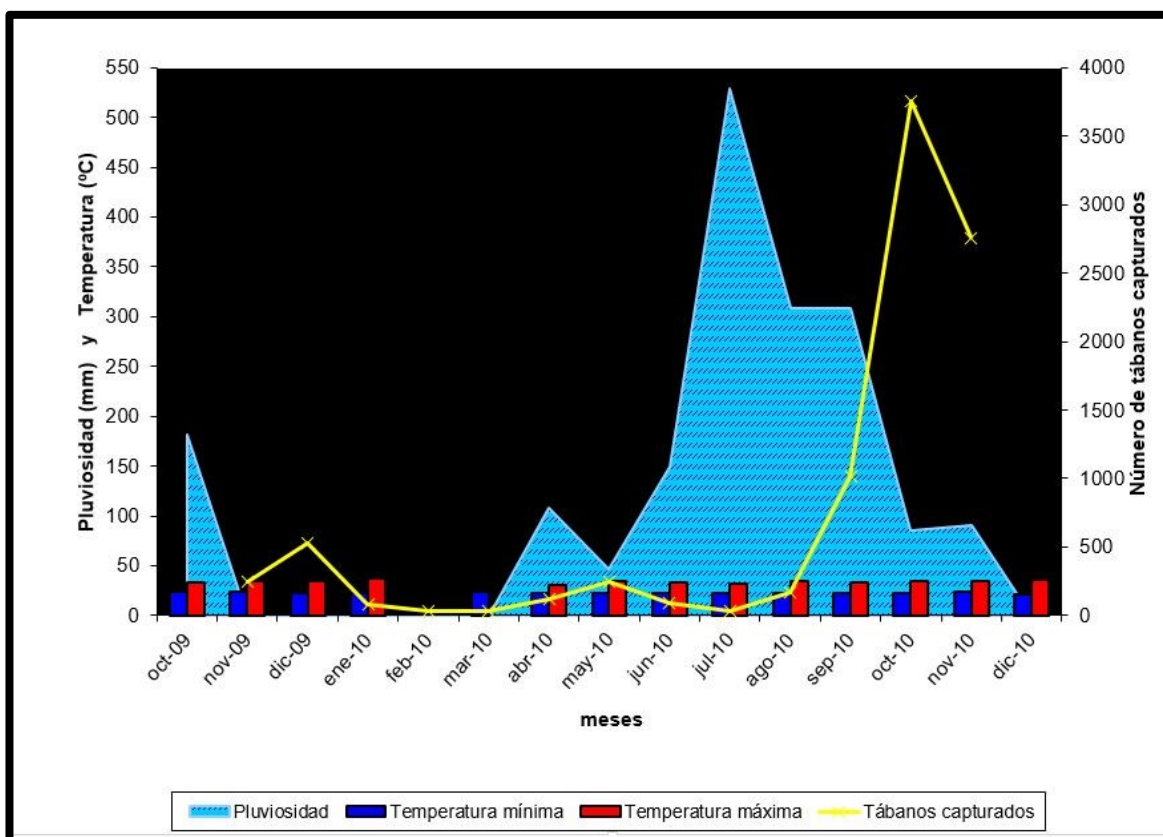


Figura 13. **Fluctuación estacional de tabánidos:** hembras colectadas mensualmente desde noviembre-2009 a noviembre-2010.

Estos resultados coinciden con los reportados por Velázquez y col., quienes en 2004, en muestreos realizados en el estado Guárico, Venezuela, observaron que las mayores poblaciones de tabánidos ocurrieron a finales del período lluvioso [112].

Por otra parte, contrastan con los reportados por Barros y Foil en 1999, quienes encontraron que la mayor abundancia de tabánidos en Pantanal, Brasil, ocurría de forma coincidente con la época de lluvia, que para esa zona inicia entre los meses de septiembre/octubre disminuyendo en abril/mayo, sin observar diferencias importantes durante los cambios transicionales [7]. Se observa, en consecuencia, que las mismas especies pueden comportarse de manera diferente cuando pertenecen a poblaciones separadas geográficamente.

La mayor biodiversidad de especies se registró en el mes de mayo (10 especies), posterior al inicio de la época lluviosa, no coincidiendo con el período de mayor abundancia, es decir de octubre-diciembre. En contraste, Velázquez y col. encontraron que la mayor biodiversidad coincidía a su vez con la mayor abundancia de tabánidos y, ambas ocurrieron posterior al umbral máximo de precipitaciones para su primer año de estudio [112]. Barros y Foil observaron el mismo comportamiento en Pantanal, Brasil [7].

El número de especies colectadas fue menor a los obtenidos por Barros y Foil en 1999, Tiape y col. en 2005 y Velásquez y col. en 2004, los cuales reportaron, respectivamente, 23 especies para la zona de Pantanal, Brasil ($n=2.832$) en dos años [7]; 20 especies para diversas zonas del estado Guárico, Venezuela ($n=1.209$) [105] y 14 especies para una finca del Sector Las Lajas del estado Guárico, Venezuela ($n=1.179$), en un año [112]. Sin embargo, se observa también que la

abundancia poblacional es mayor comparativamente en el presente estudio (n=9.133), especialmente para la especie *T. pungens* (n=7.649), encontrándose también que fue la especie más abundante en las zonas de Guárico (AR=41,9%) [112]; mientras que fue poco abundante en la zona de Pantanal (AR=3,67%) [7].

Por otra parte, considerando el bajo número de individuos macho colectados (n=11), se pudo constatar lo difícil que resulta capturarlos mediante trampas Canopy. Recomendándose para su captura otros métodos como trampas Malaise y NZI, o blandiendo redes entomológicas sobre la floresta de corte bajo, sobre todo aquella que se encuentra en período de floración.

3. Análisis estadísticos

En el ACP de la distribución de especies de tabánidos por trampa dos componentes explican el 66,8% de la variabilidad observada (Fig. 14a), la representación de las especies por trampa es heterogénea y las trampas 3 y 6, son las que recogen la mayor cantidad de información. El estudio de la variabilidad de la composición poblacional de los tabánidos por trampa estudiada (Fig. 14b) no mostró diferencias significativas, es decir que no hay variabilidad en la distribución de las especies por trampa.

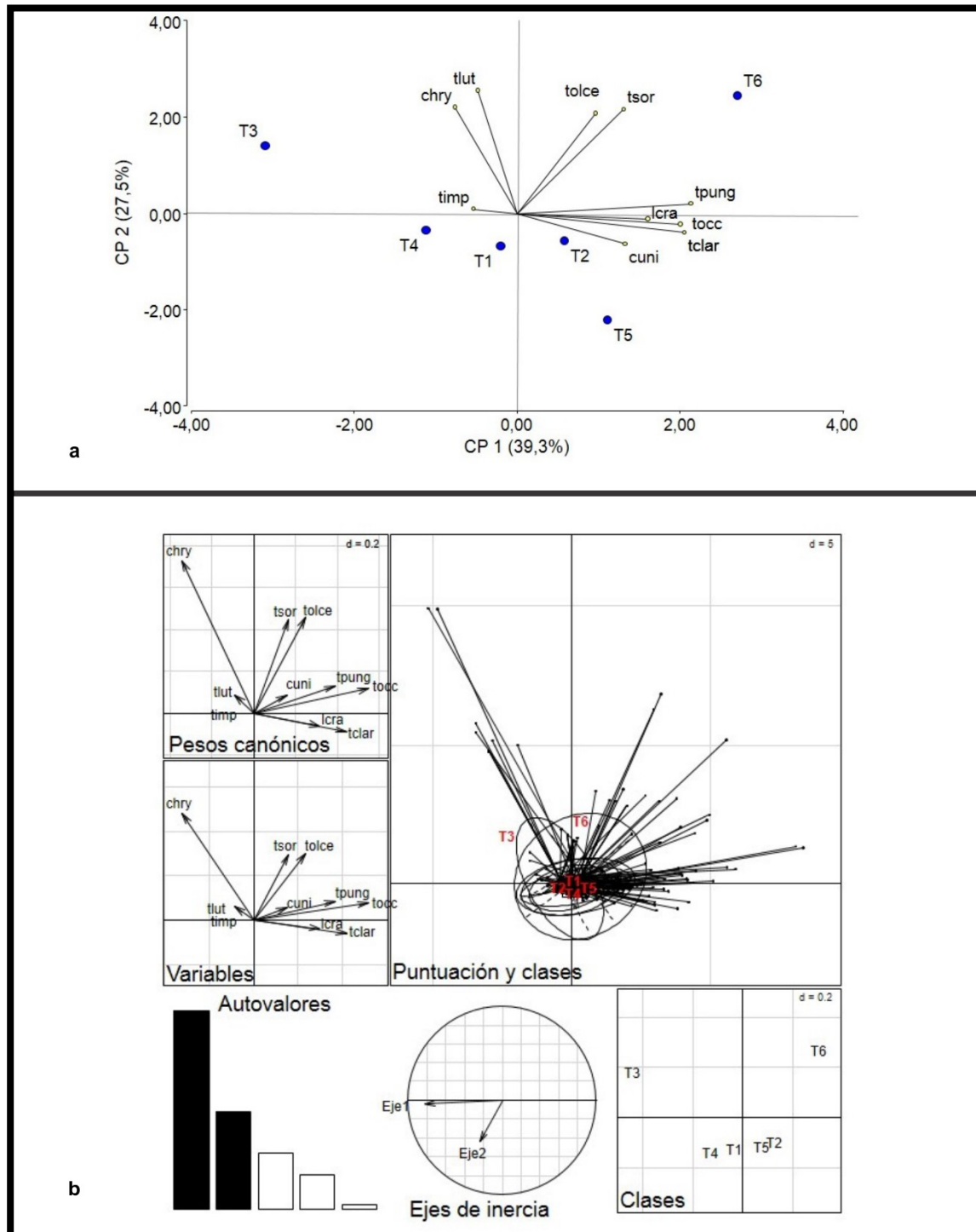


Figura 14. Análisis de componentes principales en base a trampa de colecta: a. ACP de la composición poblacional de tabánidos por trampa y b. Estudio de la variabilidad de la composición poblacional de los tabánidos entre las trampas estudiadas.

En el ACP de la distribución de especies de tabánidos por mes dos componentes explican el 67% de la variabilidad observada, mayo-10 y noviembre-10 son los meses que recogen la mayor cantidad de información y se observa como los meses donde existió mayor abundancia de individuos se agrupan en el cuadrante superior izquierdo, confirmando así la estacionalidad en noviembre y diciembre (Fig. 15a). El estudio de la variabilidad de la composición poblacional de los tabánidos por mes estudiado (Fig. 15b) muestra que mayo-10 fue disímil al resto de los meses evaluados, en concordancia con la mayor diversidad de especies, mientras que el resto de los meses se agrupó uniformemente.

En el ACP de la distribución de especies de tabánidos por hora del día dos componentes explican el 100% de la variabilidad observada (Fig. 16a), la representación de las especies parece más diversa en horas de la tarde, mientras que la especie *T. lutzii* (tlut) fue colectada predominantemente en la mañana y *Chrysops* sp. a mediodía. En el estudio de la variabilidad de la composición poblacional de los tabánidos por hora del día (Fig. 16b) se observa un patrón de distribución mayoritariamente hacia horas crepusculares, sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas, es decir que no hay variabilidad en la distribución de las especies por horario del día.

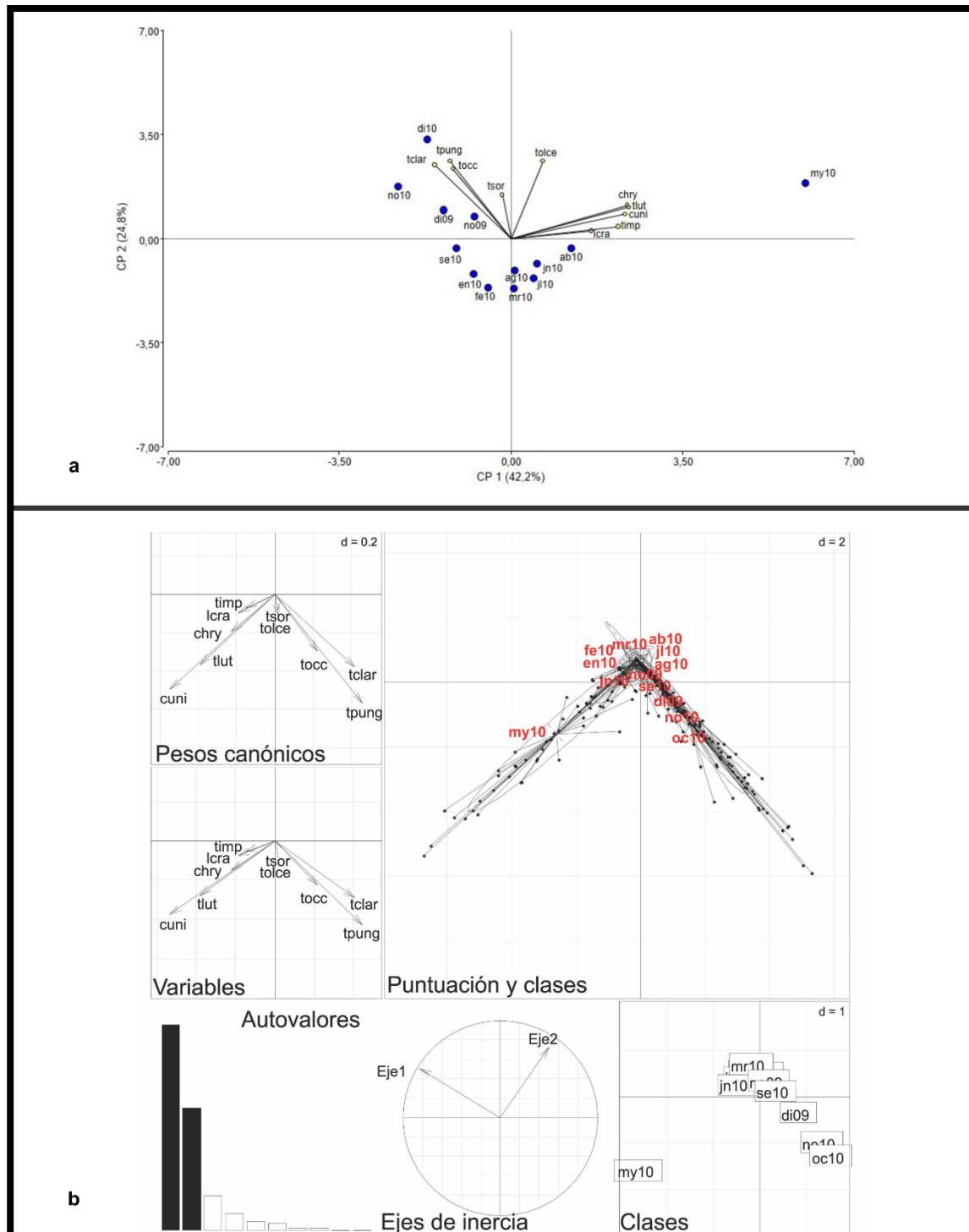


Figura 15. **Análisis de componentes principales en base a época del año:** a. ACP de la composición poblacional de tabánidos por mes y b. Estudio de la variabilidad de la composición poblacional de los tabánidos entre los meses estudiados.

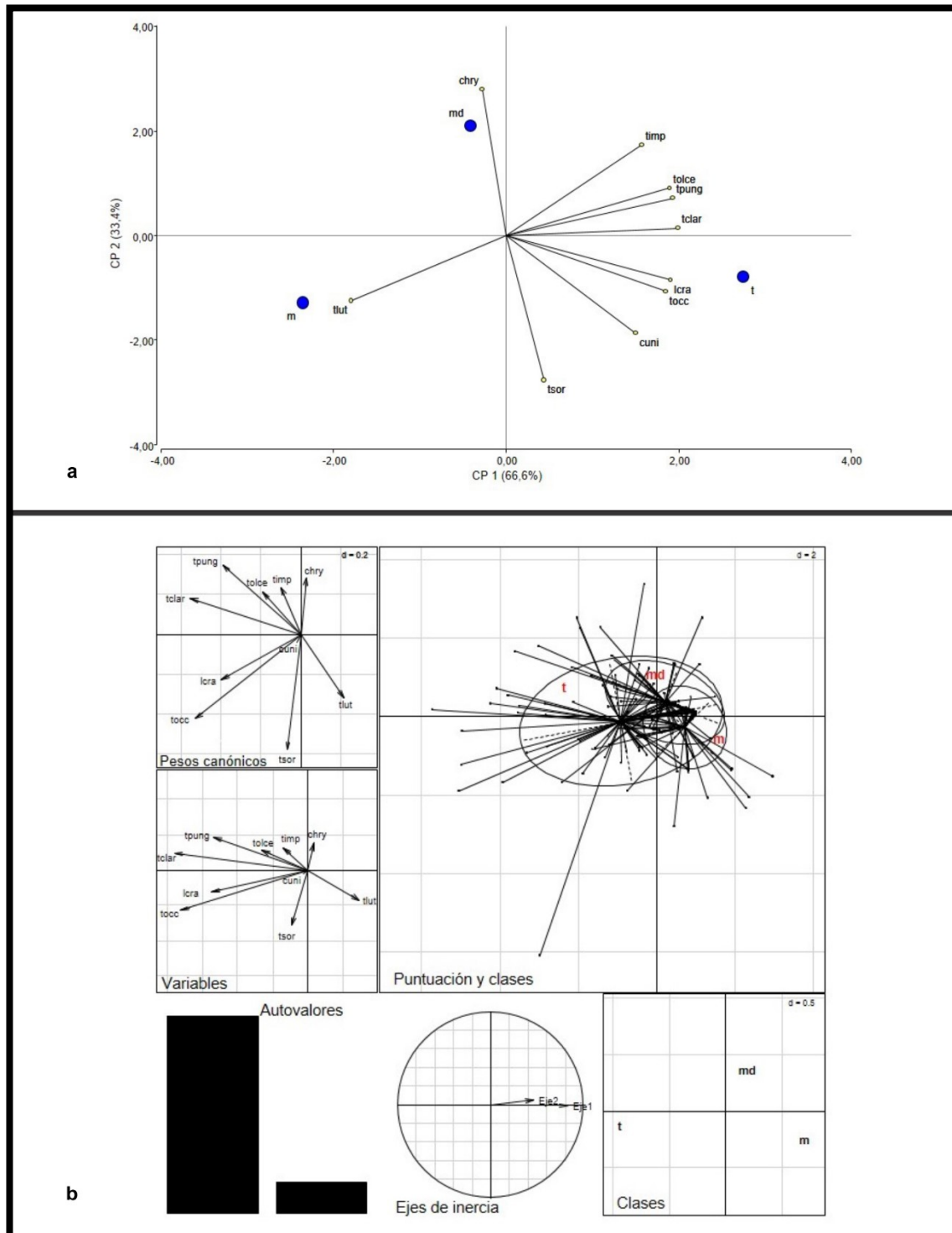


Figura 16. **Análisis de componentes principales en base a hora del día:** **a.** ACP de la composición poblacional de tabánidos por horario y **b.** Estudio de la variabilidad de la composición poblacional de los tabánidos por hora del día.

En el análisis de coinercia (Fig. 17) realizado para encontrar la estructura común por mes de los dos grupos de datos, tanto ambientales como poblacionales, se observan las proyecciones del comportamiento de los datos en los ACP, sobre los ejes de análisis de coinercia, donde la posición del punto representa el comportamiento en el espacio X (datos poblacionales) y la flecha representa el comportamiento en el espacio Y (datos ambientales). Se observan, en consecuencia, comportamientos particulares para los meses de diciembre-09, relacionado a baja diversidad de especies con alta abundancia; mayo-10, relacionándose la alta diversidad observada con bajas temperaturas; julio-10, donde convergen alta diversidad y baja abundancia con altas precipitaciones y octubre-10, mes en el que se observó diversidad intermedia y alta abundancia con predominancia importante de *T. pungens*. El resto de los meses presentan un comportamiento similar entre ellos.

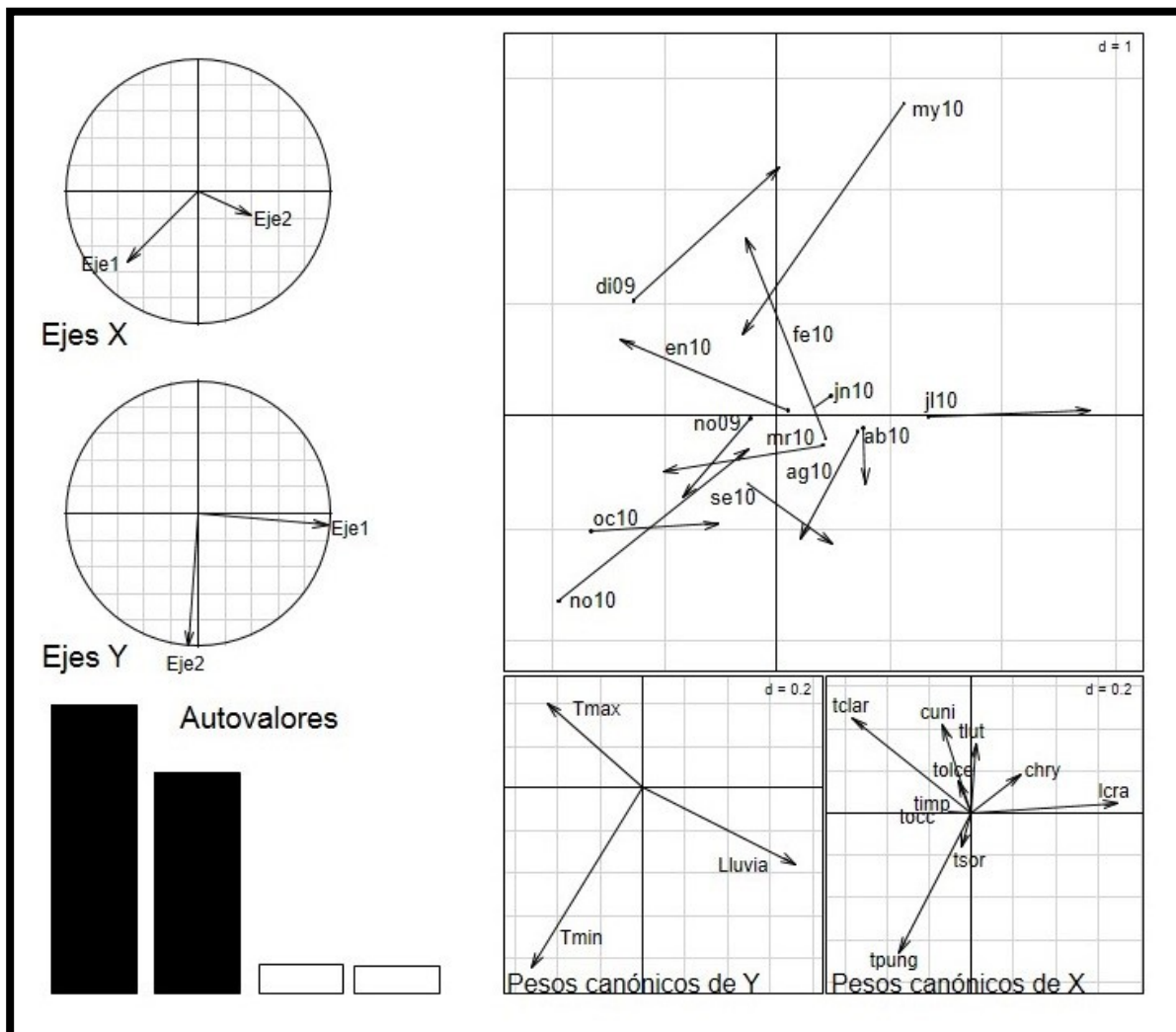


Figura 17. Análisis de coinerchia por mes de los dos grupos de datos.

El STATIS por mes de las especies colectadas (Fig. 18) mostró una configuración compromiso con predominancia de *T. pungens* y *T. claripennnis*, mientras que el resto de las especies de tabánidos presentó un comportamiento similar. Se observaron además diferencias estadísticamente significativas entre los meses de colecta, evidenciando una vez más la presencia de estacionalidad poblacional.

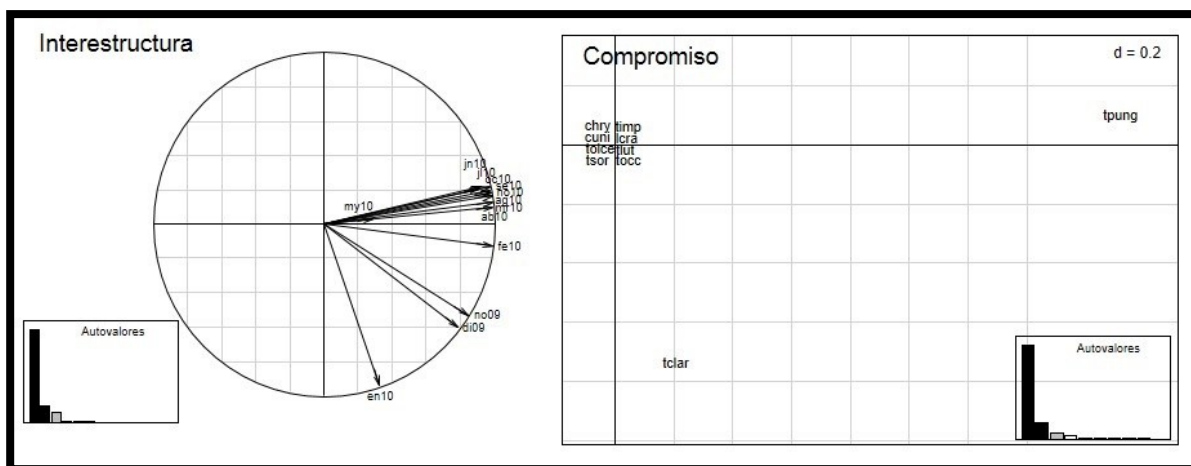


Figura 18. STATIS por mes en base a especies colectadas.

El STATIS por trampa de las especies colectadas (Fig. 19) mostró una configuración compromiso con predominancia de *T. pungens* y, en menor grado de *T. claripennnis*, mientras que el resto de las especies de tabánidos presentó un comportamiento similar. En este caso, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que la distancia entre cada una de las trampas, en el área de 9 km² donde fueron colocadas, no fue suficiente para evaluar variabilidad.

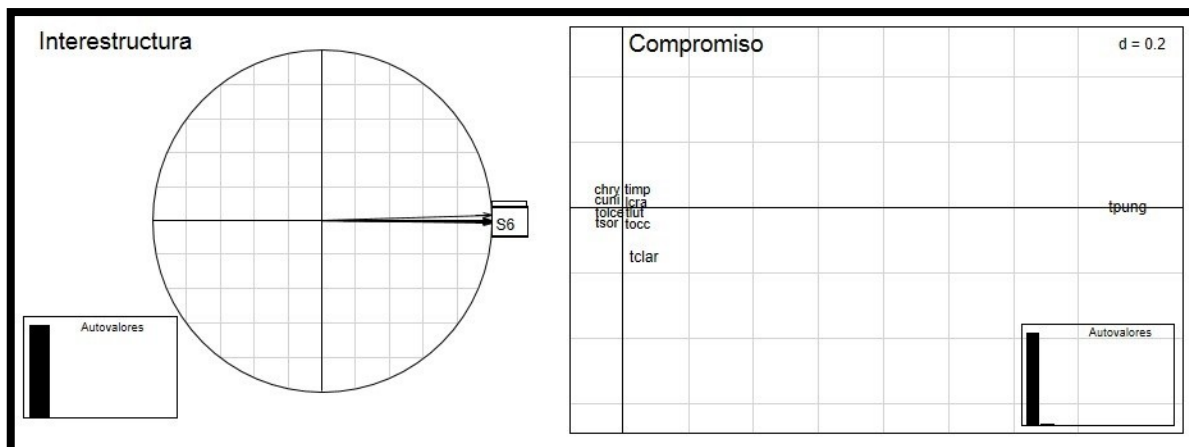


Figura 19. STATIS por trampa en base a especies colectadas.

También fueron realizados análisis de COSTATIS para evaluar el comportamiento poblacional por trampa y por hora del día de cada mes tomando en cuenta las características ambientales, sin embargo, estos análisis no aportaron información diferente adicional a la observada mediante ACP, coinercia y STATIS, por lo cual no se muestran en el presente estudio.

4. Diagnóstico molecular de tripanosoma en tabánidos alimentados

4.1. Alimentación experimental de tabánidos

Empleando la metodología descrita se obtuvieron un total de cinco muestras, dos tabánidos alimentados de ratas infectadas, identificados como 257 y 258, y tres

alimentados de rata sana, identificados como 253, 254 y 255, todas las moscas fueron de la especie *Tabanus pungens*.

4.2. Determinación de la presencia de *T. evansi* en tabánidos alimentados de ratas

Los resultados de la estandarización de la PCR se agrupan en la figura 20, donde se puede observar que para las muestras 257 y 258 se obtuvieron bandas de reconocimiento de la secuencia ITS de *T. evansi* en todas las concentraciones probadas, desde 200 hasta 2,5 ng de ADN total en la mezcla de PCR, tanto para las conservadas en papel FTA como para las conservadas en papel de filtro convencional, con excepción de la concentración 50 ng de la muestra 258 en papel FTA debido, posiblemente, a error técnico en el momento de realizar la mezcla de PCR, a pesar de lo cual es notable que las bandas muestran mejor definición cuando se utiliza papel FTA. Así mismo, el rango donde se hallaron las bandas más nítidas fue entre 200 y 10 ng para papel FTA y entre 200 y 20 para el papel de filtro, sin embargo para éste último no se obtuvieron patrones de amplificación constantes entre ambas muestras ni dentro de la misma muestra, es decir las bandas presentan intensidades diferentes independientemente de la concentración de ADN. Ninguno de los controles negativos amplificó la secuencia ITS de *T. evansi* ni patrones de bandas inespecíficos.

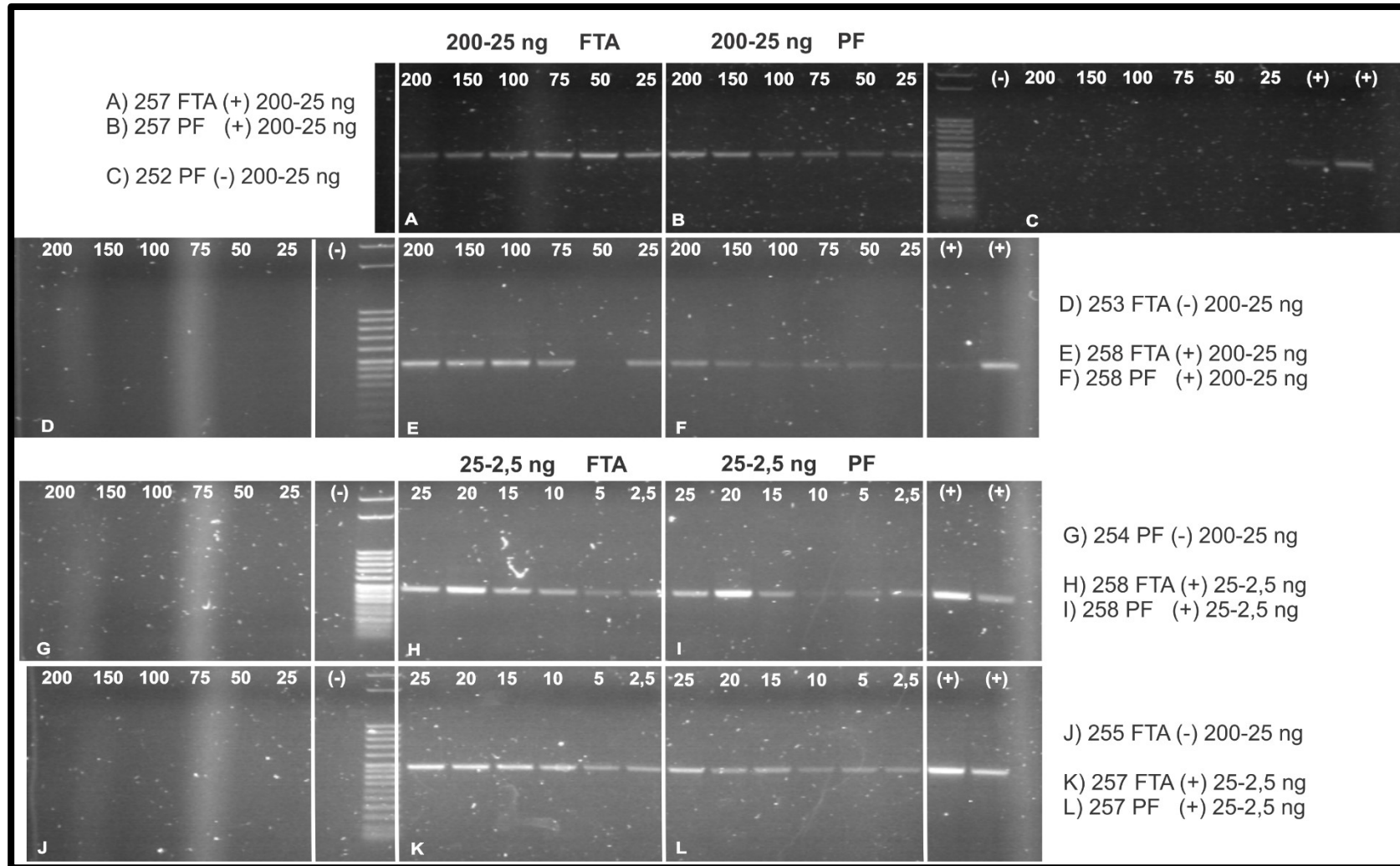


Figura 20. Resultados en geles de agarosa para la estandarización de la PCR para diagnóstico de *Trypanosoma* spp. con cebadores ITS.

Las concentraciones obtenidas para estas muestras mediante el método de extracción empleado demostraron ser altamente variables, con un promedio de 169,14 ng/ μ l y desviación estándar de 63,83 ng/ μ l para las muestras en papel FTA (n=5), mientras que aquellas en papel de filtro promediaron 72,06 ng/ μ l con $\sigma=43,21$ ng/ μ l (n=5). Esta diferencia pudo deberse a que no se realizó una medición exacta del tamaño del papel de filtro empleado y a que no se puede determinar cuantitativamente la sangre que absorbe cada papel o el que dicha absorción se realice de manera uniforme.

Tanto los métodos de conservación y extracción de ADN como el protocolo de PCR con oligonucleótidos ITS empleados en esta estandarización demostraron ser sensibles para determinar la presencia de ADN de *Trypanosoma evansi* en muestras de sangre colectada de tabánidos alimentados experimentalmente de ratas infectadas. Sin embargo, se observan resultados más constantes y nítidos empleando papel FTA, por lo que no cabe duda que se trata de un buen método de conservación de muestras de ADN. A pesar de esto, y considerando la relación costo/beneficio, se puede establecer el uso del papel de filtro convencional eficazmente para esta prueba de diagnóstico, siempre y cuando se utilicen concentraciones entre 200 y 75 ng, con las cuales se logró obtener mejor visibilidad de las bandas.

4.3. Diagnóstico de *T. evansi* y *T. vivax* en muestras de tabánidos alimentados en campo

De los 9.133 tabánidos capturados a lo largo de este estudio fueron diseccionados aproximadamente 5.000 de los cuales se hallaron 110 alimentados de forma natural, lo que corresponde al 2,2%. Este bajo porcentaje es lógico si consideramos que los tabánidos se acercan a las trampas precisamente con la intención de iniciar su alimentación más que para completarla.

Las concentraciones, medidas en nanogramos por microlitro, de aproximadamente la mitad de las muestras (n=57) conservadas en ambos papeles, fueron sometidas a una prueba de t de student para datos independientes, la cual mostró un $P > 0,05$ ($P = 0,3046$), por lo que no se encontró diferencia significativa entre las medias obtenidas de muestras conservadas en papel FTA en comparación a aquellas conservadas en papel de filtro convencional.

En cuanto al diagnóstico mediante cebadores ITS, de las 110 muestras ocho resultaron positivas a *Trypanosoma* spp. (7,2%), cinco (muestras 2, 15, 26, 27 y 28) a *T. evansi* o *T. equiperdum* (4,5%) y tres (muestras 1, 3 y 12) a *T. vivax* (2,7%) (Fig. 21a). En la figura 21b se detalla la diferencia en los tamaños de los productos de PCR, para estas especies (aproximadamente 480 vs. 200 pb), en un gel de agarosa realizado con controles positivos y marcador molecular de 50 pb.

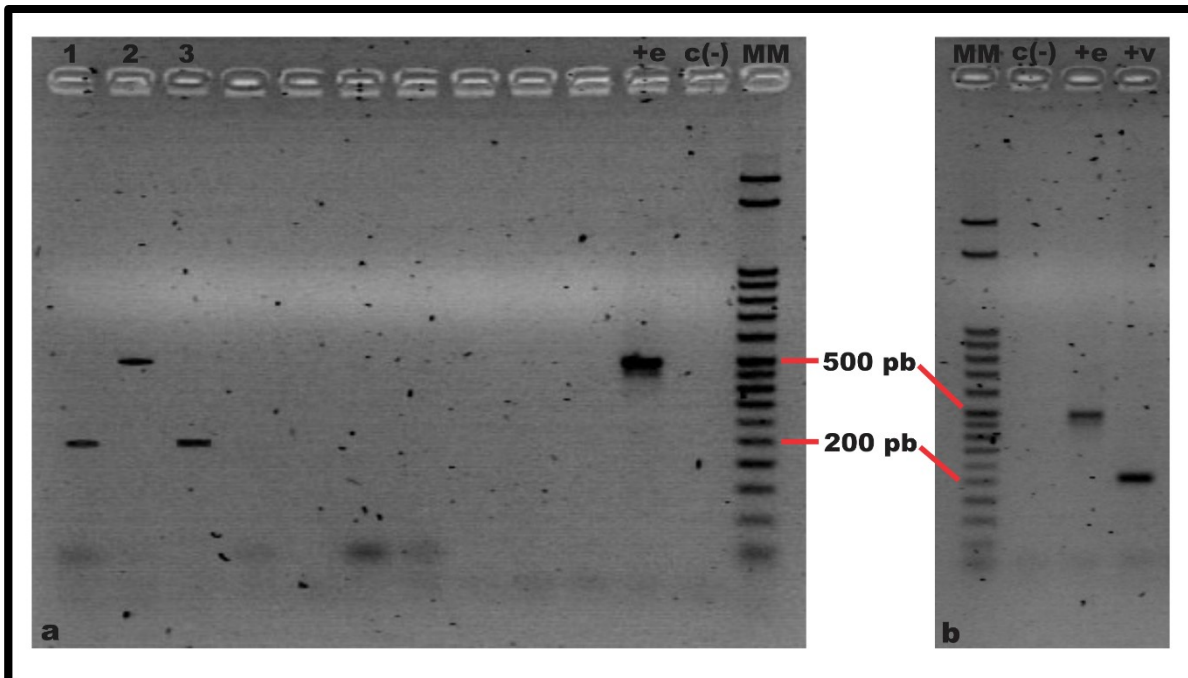


Figura 21. **Resultado en geles de agarosa de PCR para diagnóstico de *Trypanosoma* spp. con cebadores ITS:** a. carril 1 y 3 muestras de campo positivas a *T. vivax*, carril 2 muestra de campo positiva a *T. evansi*. a y b. carriles +e control positivo a *T. evansi*, carril +v control positivo a *T. vivax*, carriles c(-) control negativo y carriles MM marcador de peso molecular de 50 pb.

Las cinco muestras que mostraron un amplicón de aproximadamente 480 pb, se sometieron a PCR con los cebadores para los genes del maxicírculo citocromo b (CytB) y citocromo oxidasa (COX), no obteniéndose amplificación para las muestras 2, 15 y 28, corroborando así el diagnóstico de *T. evansi*. Mientras que para la muestra 26 se obtuvieron dos bandas de aproximadamente 1.050 y 750 pb con los cebadores para CytB (Fig. 22a) y dos bandas de aproximadamente 550 y 300 pb para COX (Fig. 22b), ninguna de ellas coincidente con los controles positivos (599 y 626 pb respectivamente), ni lo reportado en la literatura. De forma similar, para la

muestra 27 se obtuvo un amplicón de 500 pb del CytB, diferente al control positivo de 599 pb (Fig. 22a) y no hubo amplificación para COX (Fig. 22b), no lográndose determinar si efectivamente estas muestras son positivas a *T. equiperdum* o a alguna otra especie de tripanosoma; tampoco se descarta la posibilidad de que se trate de infecciones múltiples que generen amplificaciones inconsistentes, diferentes a las reportadas. Sin embargo, con estos resultados se pudo corroborar que las especies de Tabanidae potencialmente participan en la transmisión y mantenimiento del ciclo de tripanosomas en el ambiente de las zonas de producción de ganado.

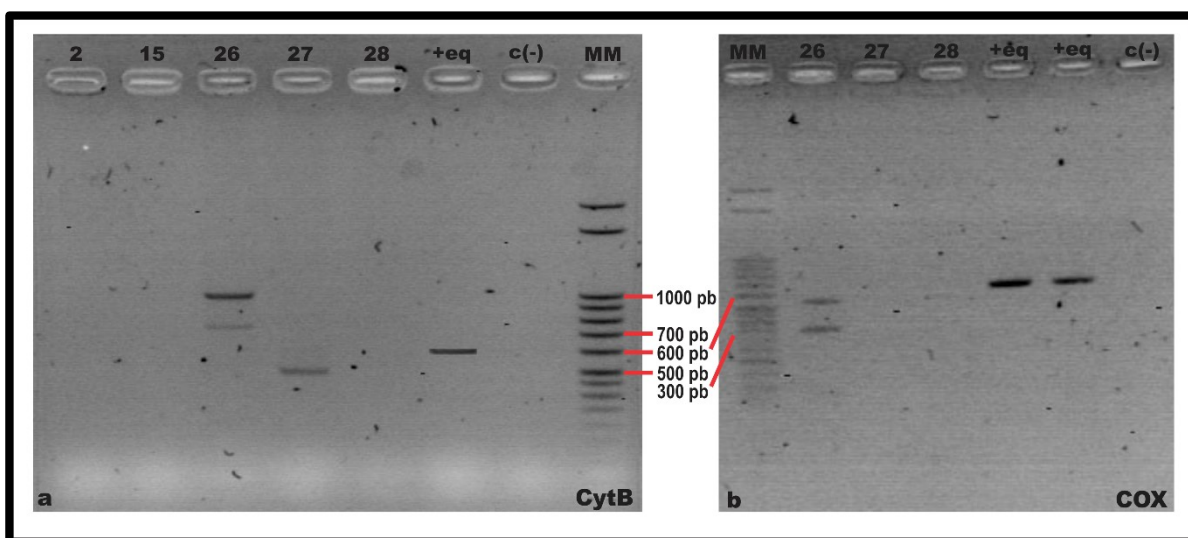


Figura 22. Resultado en geles de agarosa de PCR para diagnóstico diferencial entre *T. evansi* y *T. equiperdum* con cebadores del maxicirculo: **a. CytB**: carriles 2, 15 y 28 muestras de campo negativas a *T. equiperdum*, lo que indica que son positivas a *T. evansi*; carril 26 y 27 muestras que amplificaron productos no esperados de 1.050, 750 y 500 pb, respectivamente. **b. COX**: carril 26 productos de amplificación no esperados de 550 y 300 pb; carril 27 y 28 muestras negativas; **a y b.** carriles +eq control positivo a *T. equiperdum*, carriles c(-) control negativo y carriles MM marcador de peso molecular de 50 pb.

5. Identificación molecular de la fuente de alimentación de tabánidos mediante secuencias de citocromo b

Del total de 110 muestras de tabánidos alimentados se obtuvo amplificación de la secuencia de citocromo b de 34 muestras (30,91%). En términos generales se observó una considerable preferencia hacia aves silvestres de la especie *Ardea herodias* Linnaeus, 1758 (44,12%), seguida por rumiantes de producción *Bos taurus* (20,59%), reservorios de hemoparásitos *Hydrochoerus hydrochaeris* (17,65%) y *Rattus norvegicus* (5,88%), y en menor proporción (2,94% c/u) se hallaron *Ardea alba* L. 1758, *Bubalus bubalis*, *Caiman crocodilus* L. 1758 y *Odocoileus virginianus* Zimmermann, 1780 (Fig. 23).

La tabla II resume los resultados generados a partir de los análisis mediante BLASTn, donde se obtuvieron porcentajes de identidad de las secuencias de 100 y 99% en todos los casos, salvo la muestra N°69 que reportó solo 96% de identidad con *Bos taurus*, cuyo electroferograma presentó algunos dobles picos, los cuales fueron analizados y editados manualmente. Todos los valores esperados (en inglés e-value) resultaron menores que 0,01, lo cual se considera significativo. Este valor corresponde al número de secuencias, respecto al tamaño de la base de datos que se está usando, que obtendrían la misma puntuación por azar al ser alineadas. Por tanto, cuanto mayor sea el tamaño de la biblioteca de secuencias explorada, más significativos serán los valores esperados.

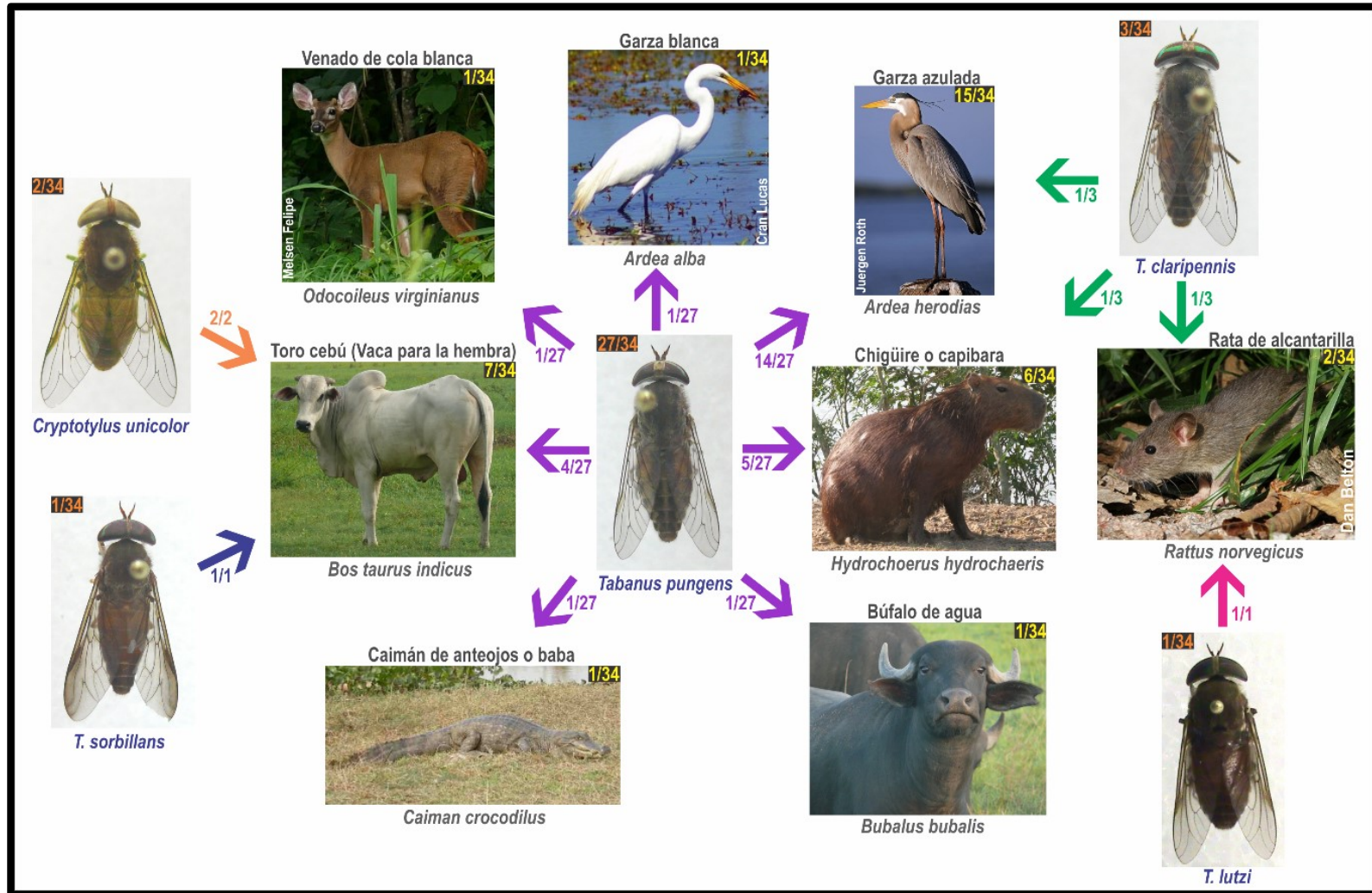


Figura 23. Distribución de hospederos para cada especie de la familia tabanidae capturada alimentada en campo: n=34 muestras.

En el material anexo 2 se observa que el alineamiento de 286 pb de las quince (15) secuencias de *Ardea herodias* (garza azulada) presenta tres mutaciones puntuales, es decir, de sustitución de bases nitrogenadas, se trata de tres transiciones presentes en todos los individuos autóctonos, a diferencia de las secuencias del GenBank® U83150 [89] con la que se obtuvo el mejor resultado de identidad en BLASTn, sin embargo no se especifica el origen de la muestra, y la AF193821 [88], que proviene de un individuo de Louisiana, Texas, USA. Se observa que en la posición 125 ocurre una transición de guanina por adenina, en la 127 timina por citosina y en la 157 citosina por timina. De igual forma en dos de las secuencias (muestras 7 y 39) ocurre una transición de guanina por adenina en la posición 226.

Las siete (7) secuencias de *Bos taurus* (vaca doméstica) (Anexo 3) fueron alineadas con las cuatro secuencias del GenBank con las que hubo identidad, seguida sus respectivas muestras. Se observa entonces que cuatro de las muestras (9, 13, 14 y 108) presentan identidad con un aislado de origen no especificado (EU365345.1), cuyo trabajo en extenso no ha sido publicado aún y a su vez, esta secuencia es idéntica, salvo por una base en la posición 301, al aislado proveniente de Panamá (KF799994.1) que presentó identidad con la muestra 4. En tres de estas secuencias (4, 13 y 14) se observa una posible delección debido a la pérdida de una adenina en la posición 8 del alineamiento, aunque no se descarta que pudiera tratarse de un error de secuenciación. Por otro lado, la muestra N°68 difiere de las demás autóctonas en cuatro transiciones: mutación de citosina por timina en la posición

187, la cual también está presente en la muestra 69 y en los aislados del GenBank AY521041.1 proveniente de China y AY682375.1 de España, mutación de guanina por adenina en la posición 190, timina por citosina en la 217 y citosina por timina en la 236, las tres presentes en el aislado español y en la muestra 69; la cual es la que presenta mayor diferencia con sus cercanas geográficamente, sin embargo muestra identidad con el aislado español, del cual difiere en 8 bases nitrogenadas por lo que presentó una identidad de 96% en BLASTn y de 95% en BioEdit.

Las seis (6) secuencias de 299 pb obtenidas de *Hydrochoerus hydrochaeris* (Chigüire) fueron comparadas con su homóloga proveniente de Beni-Bolivia (GU136721.1) [31], contra la cual presentó una identidad de 99% en BlastN, además se incluyó una secuencia proveniente de Brasil (FJ430787.1) y dos de Colombia (JF837505.1 y JF837502.1). En el anexo 4 se observa una transición de citosina por timina en la posición 110, presente en los aislados autóctonos y de Colombia, pero no en los de Bolivia y Brasil. Además de una transversión de citosina por adenina en la posición 299, presente en todos los aislados de este estudio en comparación con el de Bolivia, las demás secuencias no alcanzan esta posición.

Las dos (2) secuencias de 296 pb de *Rattus norvegicus* (Rata gris o rata de alcantarilla) alinean en la posición 14.269 del genoma mitocondrial de esta especie disponible en el GenBank (KM657953.1) proveniente de China (Anexo 5) y presenta una sola transición de adenina por guanina en la posición 294.

Se obtuvo un alineamiento de 264 pb de la única secuencia de *Ardea alba* (garza blanca) encontrada en los tabánidos con su homóloga en el GenBank (AF193822.1), la cual mostró dos transiciones puntuales: adenina por guanina en la posición 40 y timina por citosina en la posición 211 (Anexo 6).

La única secuencia obtenida de 298 pb de *Bubalus bubalis* (búfalo) mostró 100% de identidad con 30 secuencias en BLASTn, en la tabla II se reporta únicamente el primer resultado obtenido, mientras que para el alineamiento en BioEdit (Anexo 7) se escogieron ocho secuencias de diversas publicaciones, destacándose la ausencia de mutaciones entre aislados de varias partes del mundo, a diferencia de lo reportado en Pakistán, en 2012, donde hallaron cuatro haplotipos diferentes en el citocromo b de búfalos de la raza Nili-Ravi [84].

La secuencia de 303 pb de *Caiman crocodilus* (baba) alinea en la posición 14.590 del genoma mitocondrial completo de un aislado venezolano de esta especie [58] (AJ404872.2), una secuencia parcial de origen no especificado (JF315306.1) y una secuencia parcial proveniente de India (GU331894.1), estas tres secuencias son idénticas entre ellas en el segmento alineado; sin embargo, la muestra 24 de este estudio difiere de ellas en dos bases: una transversión de adenina por timina en la posición 259 y una transición de adenina por guanina en la posición 300 (Anexo 8).

Finalmente la única secuencia de *Odocoileus virginianus* (Venado de cola blanca) obtenida se alinea en la posición 14.277 del genoma completo de la mitocondria disponible en GenBank® para esta especie (JN632671.1), con la que se observó una identidad de 99%. En el alineamiento de 307 pb de estas secuencias se observa una única mutación de guanina por adenina en la posición 288 al compararlo con su homólogo más cercano proveniente de Guyana Francesa [50], mientras que con aislados de Colombia [50] y Estados Unidos [21], presenta mayor divergencia: 8 transiciones y 2 transversiones para ambas comparaciones, pero en distintas posiciones de las secuencias (Anexo 9).

Las diferencias encontradas en las secuencias dentro de la misma especie tienen consistencia con las características del material genético estudiado y con el entorno que lo rodea; ya que el ADN mitocondrial, a diferencia del ADN nuclear, no se encuentra protegido por histonas y está continuamente expuesto a la acción de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. Adicionalmente se conoce que los sistemas genéticos de reparación del ADN mitocondrial son menos eficientes que los nucleares, lo cual deriva en altas tasas de mutación y fijación de las mismas, sobre todo en poblaciones geográficamente distantes. Polimorfismos similares del gen citocromo b, como los hallados en las muestras de chigüire de este estudio, se pueden encontrar en las poblaciones silvestres, especialmente dentro de aquellas que demuestran una amplia gama de distribución geográfica [71]. En contraste, altas similitudes a pesar de la distancia geográfica, como la observada

en la secuencia de búfalo, puede explicarse tomando en cuenta que la primera importación de búfalos a la región de Apure data del año 1964 [64], extremadamente cerca en escala de tiempo evolutivo. Por su parte, la gran variabilidad en las secuencias obtenidas de vaca doméstica cobra sentido tomando en cuenta que se trata de una especie con amplia diversidad racial que ha sido introducida al territorio nacional en diversas épocas y proveniente de diferentes países. Por otra parte, la variabilidad de las secuencias de citocromo b de una especie a otra es clara, por lo que permite establecer sin lugar a dudas la fuente de alimentación de los tabánidos capturados en campo. Sin embargo, el porcentaje de eficacia de la técnica (30,91%, n=110) obtenido fue menor que el reportado en Darién, Panamá, donde se logró identificar el 78,6% de los hospederos de Culicidae (338/430) [66], y también menor que en Queens, New York, EUA, de 247 muestras de Culicidae en las que se logró identificar la fuente de alimentación de 159 (64%) [6]; esto pudo ser debido a la calidad de las muestras de sangre colectadas, la mayoría de las cuales se notaba en digestión avanzada por parte del insecto, en tal sentido, estudios realizados en *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy, 1830) con los mismos cebadores, demostraron que 48 y 72 horas después de la alimentación artificial de las moscas tse-tse con sangre de oveja, cuatro de cinco (4/5) muestras resultaron positivas, luego de 96 horas solo tres de cinco (3/5) y a las 120 horas ninguna (0/5) mostró positividad a la PCR [93].

Tabla II. Resultados del análisis BlastN de las secuencias de citocromo b obtenidas de tabánidos alimentados en campo.

Muestra	Especie de Tabanidae capturado	Especie de vertebrado identificada	Nombre común	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
26	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea alba</i>	Garza blanca	472	472	99%	2,00E-129	99%	AF193822.1
5	<i>Tabanus claripennis</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	324	324	98%	4,00E-85	99%	U83150.1
7	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	481	481	100%	3,00E-132	99%	U83150.1
8	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	508	508	100%	2,00E-140	99%	U83150.1
11	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	462	462	100%	1,00E-126	99%	U83150.1
19	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	444	444	100%	4,00E-121	99%	U83150.1
31	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	486	486	100%	7,00E-134	99%	U83150.1
35	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	518	518	100%	1,00E-143	99%	U83150.1
36	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	455	455	100%	2,00E-124	99%	U83150.1
37	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	285	285	100%	1,00E-73	99%	U83150.1
39	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	488	488	100%	2,00E-134	99%	U83150.1
46	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	517	517	100%	5,00E-143	99%	U83150.1
56	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	490	490	100%	6,00E-135	99%	U83150.1
58	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	503	503	100%	7,00E-139	99%	U83150.1
90	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	507	507	100%	6,00E-140	99%	U83150.1
94	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Ardea herodias</i>	Garza azulada	480	480	100%	3,00E-132	99%	U83150.1
4	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca doméstica	515	515	100%	2,00E-142	100%	KF799994.1
9	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca doméstica	497	497	99%	4,00E-137	100%	EU365345.1
13	<i>Cryptotylus unicolor</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca doméstica	515	515	100%	2,00E-142	100%	EU365345.1
14	<i>Cryptotylus unicolor</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca doméstica	524	524	100%	3,00E-145	100%	EU365345.1
68	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca doméstica	493	493	100%	6,00E-136	99%	AY521041.1
69	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca doméstica	390	390	100%	5,00E-105	96%	AY682375.1
108	<i>Tabanus sorbillans</i>	<i>Bos taurus</i>	Vaca doméstica	340	340	99%	5,00E-90	100%	EU365345.1
24	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Bubalus bubalis</i>	Búfalo de agua	549	549	100%	1,00E-152	100%	JQ241283.1
41	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Caiman crocodilus</i>	Baba	544	544	99%	5,00E-151	99%	AJ404872.2
6	<i>Tabanus claripennis</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Chigüire	486	486	98%	8,00E-134	99%	GU136721.1
25	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Chigüire	499	499	100%	1,00E-137	99%	GU136721.1
28	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Chigüire	504	504	100%	3,00E-139	99%	GU136721.1
29	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Chigüire	491	491	100%	2,00E-135	99%	GU136721.1
45	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Chigüire	509	509	99%	7,00E-141	99%	GU136721.1
74	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	Chigüire	508	508	100%	3,00E-140	99%	GU136721.1
30	<i>Tabanus pungens</i>	<i>Odocoileus virginianus</i>	Venado de cola blanca	490	490	100%	5,00E-135	99%	JN632671.1
10	<i>Tabanus lutzi</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata gris o rata de alcantarilla	506	506	99%	9,00E-140	100%	KM657953.1
65	<i>Tabanus claripennis</i>	<i>Rattus norvegicus</i>	Rata gris o rata de alcantarilla	387	387	100%	4,00E-104	100%	KM657953.1

6. Dinámica de la seroprevalencia de *Trypanosoma* spp. en un grupo de novillas tratadas de forma profiláctica.

En diciembre del 2009 fue muestreado un total de 320 animales del grupo de 513 novillas, de las cuales 242 (75,6%) mostraron seropositividad a *Trypanosoma* spp. y 78 (24,4%) fueron negativas (PC=0,184). Para marzo del 2010 se tomaron 420 muestras del mismo grupo, resultando 242 (57,6%) positivas y 178 (42,4%) negativas (PC=0,400). En junio del 2010 el total de muestras obtenidas ascendió a 452 con 188 (41,6%) positivas y 264 (58,4%) negativas (PC=0,446). Mientras que para el último muestreo, en septiembre del mismo año, se alcanzó a muestrear casi la totalidad del grupo de novillas, colectando 502 muestras, donde 268 (53,4%) fueron positivas y 234 (46,6%) negativas (Fig. 24). La disparidad observada en la población (n) de cada muestreo obedece a manejos propios del hato y condiciones climáticas particulares de cada época del año, que no permitieron recoger todos los animales en los días seleccionados para las tomas de muestras, sin embargo los valores se ajustaron a porcentaje eliminando así las diferencias.

Al comparar, estadísticamente, los valores obtenidos mediante pruebas de chi cuadrado, se observó diferencia significativa entre los muestreos de diciembre-2009 y marzo-2010 ($P < 0,0001$), entre los muestreos de marzo-2010 y junio-2010 ($P < 0,0001$), igualmente entre junio-2010 y septiembre-2010 ($P = 0,0003$). Considerando que entre los últimos dos muestreos se incrementó la

seroprevalencia, se puede concluir que el medicamento fue perdiendo su efectividad a medida que se alejó del momento de su aplicación. Además se pudo observar una diferencia altamente significativa (22,2%) entre el muestreo inicial de diciembre-2009 y el final realizado en septiembre-2010 ($P < 0,0001$), por lo que se puede considerar beneficiosa la medida sanitaria aplicada, aunque no del todo efectiva.

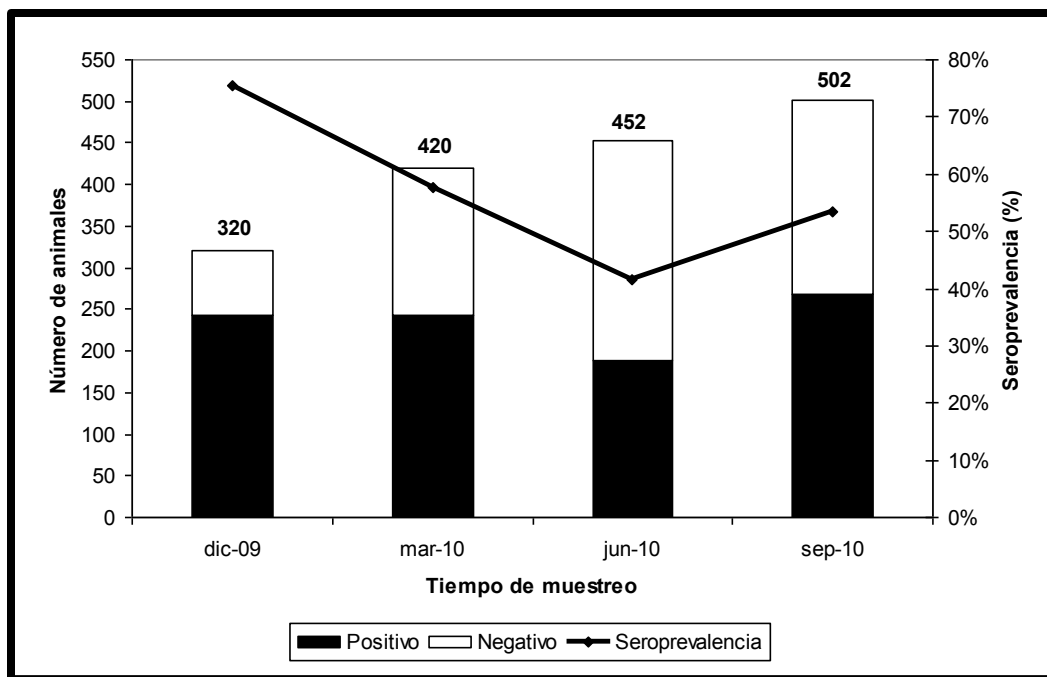


Figura 24. Número de animales positivos vs. negativos y porcentaje de prevalencia en relación a la población muestreada trimestralmente

En la Figura 24 se puede apreciar, las proporciones entre animales positivos (negro) y negativos (blanco) por muestreo y el comportamiento de la seropositividad a *Trypanosoma* spp. durante el estudio, la cual mostró una disminución progresiva

hasta los seis meses posteriores a la aplicación del tratamiento, para luego incrementarse nuevamente. Estos resultados coinciden con las recomendaciones de los laboratorios que elaboran la droga, que señalan una efectividad de dos a seis meses, dependiendo de la cepa de tripanosoma involucrada.

Un hallazgo de interés en este estudio fue la comprobación del alto porcentaje de bovinos seropositivos a tripanosoma en campo; aunque no se registró ningún caso clínico y/o crónico, y tampoco se logró demostrar la presencia del parásito mediante las pruebas directas que se realizaron a una proporción del grupo de novillas. Se observa entonces que estos animales desarrollan infecciones subclínicas que favorecen la permanencia del parásito en la zona. Cabe destacar que los resultados de este estudio concuerdan con investigaciones realizadas en otros estados del país; por ejemplo, en Guárico, se reporta una seroprevalencia para tripanosomosis de 60% (n=193) en tres fincas de los municipios Roscio y Ortiz [99]. Sin embargo, en infecciones naturales, es común encontrar seroprevalencias diferentes entre los diversos estudios que se realizan o en un mismo estudio que abarque distintas zonas de muestreo. En 2007, González y Meléndez reportaron para el estado Carabobo seroprevalencias entre 50 y 60% para los sectores El Charal, Anca y San Pablo, mientras para los sectores Canoabito, Alpargatón y Río Abajo sólo obtuvieron valores entre 10 y 15% [48]. Se observa entonces que la prevalencia de la enfermedad puede verse afectada por factores inherentes al estado, dependientes de la geografía particular de la zona o, inclusive, entre hatos cercanos o vecinos,

debido principalmente a manejos propios de cada sistema productivo, tales como planes sanitarios, control de vectores, etc.

VII. CONCLUSIONES

El estudio integral de la tripanosomosis en una unidad de producción, además de constituir un aporte al conocimiento de la misma, permitió obtener una visión amplia del comportamiento de todos los factores involucrados en la patología, es decir, patógeno, vector, reservorio y hospedero. Se recolectó, en un mismo marco investigativo lo que previamente se hacía de forma aislada, constituyendo el primer trabajo global evaluativo de una explotación pecuaria a nivel de una patología tan ampliamente difundida como lo es la tripanosomosis.

Se constató la presencia activa y pasiva de los tripanosomas en cada uno de los organismos involucrados en su ciclo de vida. La presencia activa se observó en los vectores (tabánidos) mediante PCR, en los que se identificó tanto tripanosomas como sangre de reservorios silvestres (chigüires, ratas, aves y reptiles) y hospederos, silvestres y de producción (venado, vaca doméstica y búfalo). Esto nos da una idea de la relevante importancia de los tabánidos en su papel como vectores de tripanosomiasis y, potencialmente, de otras patologías, en nuestras unidades de producción. Y adicionalmente, abre las puertas de un área no tomada en cuenta

hasta ahora en nuestro país, como lo es el estudio de las relaciones vector-reservorio-hospedero dentro de la familia Tabanidae, en el cual se observó que, pesar del alto porcentaje de aves halladas como fuente de alimentación, la diversidad de hospederos nos indica que estas moscas tienen la capacidad de alimentarse de, prácticamente, cualquier clase de vertebrados terrestres.

La presencia pasiva de tripanosomas fue corroborada mediante los ELISA realizados con suero sanguíneo de bovinos en producción, en los cuales se observó una alta seroprevalencia contra tripanosoma ($\geq 41,6\%$) durante toda la investigación. La evaluación directa de tripanosomosis en el ganado se recomienda a las explotaciones pecuarias, pues resulta ser un buen indicador de la situación presente, la logística de realización es relativamente sencilla y los costos de su aplicación pueden considerarse convenientes y justificarse ampliamente con los resultados recabados en las pruebas de diagnóstico.

El estudio de dinámica estacional de vectores demostró que los animales evaluados estuvieron expuestos, en mayor o menor densidad, a la picadura de moscas hematófagas de la familia tabanidae durante todo el año. A su vez, una población abundante de insectos hematófagos puede estar relacionada a factores agroecológicos que favorecen su ciclo de vida, como la espesa y cerrada vegetación presente en los bosques de galería y las amplias zonas inundables, que se mantienen anegadas inclusive varios meses después de la finalización de la

temporada lluviosa. Los análisis estadísticos corroboraron una estacionalidad poco diversa concentrada en los meses de octubre a diciembre, por lo que, en términos de manejo, se recomienda que las medidas a emplear para el control de estos vectores se incrementen hacia el final del período de lluvia, cuando aumenta considerablemente la abundancia de los mismos. También destaca el hecho de que el período de mayor diversidad de especies (mayo) se registró alejado del período de mayor abundancia de individuos. La ubicación de las trampas en un área de 9 km² no mostró diferencias significativas entre trampas en la cantidad de individuos colectados y, aunque se observó un patrón hacia horas vespertinas, los horarios de captura (mañana, mediodía y tarde) tampoco registraron diferencias estadísticamente significativas.

En términos generales, la obtención de datos para este tipo de estudios es de largo plazo y requiere constancia, compromiso y dedicación por parte del personal humano encargado, es claro que no da respuestas inmediatas y puede no ser atractiva a los productores para ser iniciada desde cero, pero es posible originar un diagnóstico presuntivo, en base al comportamiento observado en este estudio, que incluya una encuesta a realizarse a los trabajadores de la zona, que por lo general son personas muy observadoras de su entorno, de tal forma que se establezca el período de mayor abundancia de vectores y concentrar en éste el esfuerzo para combatirlos.

Por su parte, el medicamento evaluado para el tratamiento de los animales demostró ser medianamente efectivo para disminuir la prevalencia de tripanosomosis en los animales sólo durante los primeros seis meses. Por lo que se recomienda, como medida correctiva, la rotación de fármacos con otros principios activos para controlar la prevalencia; por ejemplo la aplicación de un fármaco del tipo diminaceno. Igualmente se recomienda continuar el monitoreo de la tripanosomosis.

La ausencia de infecciones activas por tripanosoma en el ganado, sumado a la ausencia de casos clínicos, a pesar de la prevalencia observada, sugiere que las cepas circulantes en el área de estudio presentan baja patogenicidad, sin embargo, no se cuenta con los estudios correspondientes sobre su virulencia, debido a que en los muestreos realizados no se logró aislar y perpetuar las cepas.

La evaluación multifactorial de la tripanosomosis animal como propuesta de estudio integral para explotaciones rurales nos da un panorama completo de su situación para el momento del estudio, facilita la toma de decisiones y la implementación de medidas control, y los resultados obtenidos podrían ser utilizados de forma predictiva en otras unidades de producción pecuaria de la zona.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A, Lichtman A (2004) **Inmunología Celular y Molecular**, 5ta ed. Elsevier, España. p.478.
2. Abbas A, Lichtman A, Pober J (2002) **Inmunología Celular y Molecular**, 4ta ed., McGraw-Hill Interamericana, España. p.488
3. Agudo L, Tamasaukas R, Silva-Ravelo A, Sánchez J, Ron J, Fernández M, Florio-Luis J, Vintimilla-Tamasaukas M, Colmenares O, Rivera S (2009) **Tipo bovino trypanotolerante y trypanosusceptible doble propósito en la región de los llanos centrales de Venezuela. I: Identificación y caracterización Fenotípica**. Revista Electrónica Veterinaria 10(10):1-23.
4. Alcaldía del Municipio Muñoz (Fecha desconocida). Disponible desde internet en: <http://munoz-apure.gob.ve/portal-alcaldias/>. [Con acceso el 13 jul 2009]
5. Alfaro C, García F, Parra N, Reyna-Bello A, Perrone T (2007) **Evaluación preliminar de la tripanosomosis bovina en dos zonas ganaderas del estado Monagas**. Boletín de Malariología y Salud Ambiental 47(Supl. 1):314.
6. Apperson CS, Harrison BA, Unnasch TR, Hassan HK, Irby WS, Savage HM, Aspen SE, Wesley-Watson D, Rueda LM, Engber BR, Nasci RS (2002) **Host-feeding habits of Culex and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the Borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of Culex mosquitoes**. Journal of Medical Entomology 39(5):777-785.
7. Barros ATM, Foil LD (1999) **Seasonal occurrence and relative abundance of Tabanidae (Diptera) from Pantanal region, Brazil**. Memoirs of Entomology International 14:387-396.
8. Barros ATM, Gorayeb I (1996) **Chave de identificação para tabanídeos (Diptera: Tabanidae) do Pantanal, sub-região da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Revista Brasileira de Biologia 56(23):547-551.
9. Bassi RA, Costa M, Coscarón S (2000) **Estudo do comportamento de tabanídeos (Diptera, Tabanidae) do Brasil**. Acta Biologica Paranaense, Curitiba 29(1-4):101-115.
10. Benchimol JL, Sá MR (2005) **Adolpho Lutz. Obra Completa. Entomologia: Tabanidae**. Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro - Brasil 2(2):625-650.
11. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL (2005) **GenBank**. Nucleic Acids Research 33:34-38. doi: 10.1093/nar/gki063

12. Bereczky S, Martensson A, Gil JP, Färnert A (2005) **Short report : Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum***. The American journal of tropical medicine and hygiene 72(3):249-251.
13. Briceño-Iragorry L (1956) **Contribución al estudio de los Tabánidos en Venezuela**. Memoria de la Sociedad de Ciencias Naturales La Salle 45(16):258-267.
14. Bruce WN, Decker GC (1951) **Tabanid control on dairy and beef cattle with synergized pyrethrins**. Journal Economy Entomology 44:154-159.
15. Burger JF (1994) **Familia Tabanidae (Tábanos)**. En: Las familias de insectos de Costa Rica. Javier Solís (Ed.) Instituto Nacional de Biodiversidad de Costa Rica. Disponible desde internet en: <http://www.inbio.ac.cr/papers/insectoscr/Texto654.html>. [Con acceso el 31 ago 2009].
16. Callan EM (1952) **Observations on the distribution of Tabanidae in the Caribbean area, with new records of species from Trinidad, B.W.I. (Diptera)**. Psyche 59:37-40.
17. Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J (2004) **The ade4 package - I : One-table methods**. R News 4(1):5-10.
18. Clarkson M, McCabe W, Colina H (1971) **Bovine trypanosomiasis in Venezuela**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 65(2):257-258.
19. Coscarón S (1979) **Notas sobre tabánidos argentinos. XV. El género *Tabanus* Linnaeus (Diptera: Tabanidae)**. Obra del Centenario del Museo de La Plata 6:251-273.
20. Coscarón S, Papavero N (1993) **An illustrated manual for the identification of the neotropical genera and subgenera of Tabanidae (Diptera)**. Museu Paraense Emílio Goeldi Coleção Emílio Snethlage Belem do Pará-Brasil 150pp.
21. Cronin MA, Macneil MD, Patton JC (2006) **Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and relationships with wild caribou (*Rangifer tarandus granti*, *Rangifer tarandus groenlandicus*, and *Rangifer tarandus caribou*)**. Journal of Heredity 97(5):525-530.
22. Cuadras CM (2014) **Nuevos métodos de análisis multivariante**, 4ta ed. CMC Editions, Barcelona-España. 304pp. Disponible desde internet en:

- <http://www.ub.edu/stat/personal/cuadras/metodos.pdf> [Con acceso el 02 dic 2015].
23. Dargantes AP (2010) **Epidemiology, control and potential insect vectors of *Trypanosoma evansi* (surra) in village livestock in southern Philippines.** Tesis PhD. Murdoch University. 230pp.
 24. Dobson RJ, Dargantes AP, Mercado RT, Reid SA (2009) **Models for *Trypanosoma evansi* (surra), its control and economic impact on small-hold livestock owners in the Philippines.** International Journal for Parasitology 39:1115–1123.
 25. Dolédec S, Chessel D (2004) **Coinertia Analysis: an alternative method for studying species-environment relationships.** Freshwater Biology 31(3):277–294. doi: doi:10.1111/j.1365-2427.1994.tb01741.x
 26. Dray S, Chessel D, Thioulouse J (2003) **Co-Inertia analysis and the linking of ecological data tables.** Ecology 84(11):3078–3089.
 27. Dray S, Dufour AB (2007) **The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists.** Journal of Statistical Software 22(4):1-20.
 28. Dray S, Dufour AB, Chessel D (2007) **The ade4 package-II: Two-table and K-table methods.** R News 7(2):47-52.
 29. Dufour AB (2009) **Coinertia analysis.** Logiciel R version 2.8.1. pp.2-11 Disponibles desde internet en: <http://pbil.univ-lyon1.fr/R/pdf/course6.pdf>. [Con acceso el 15 nov 2015].
 30. Duncan E, Setzke E, Lehmann J (2004) **General considerations for the storage of sample material prior to DNA purification.** En: Quiagen News. Disponible desde internet en: http://www1.qiagen.com/literature/qiagennews/weeklyArticle/04_03/e8/default.aspx. [Con acceso el 14 abr 2010].
 31. Dunnum JL, Salazar-Bravo J (2010) **Molecular systematics, taxonomy and biogeography of the genus *Cavia* (Rodentia: Caviidae).** Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 48(4):376-388.
 32. Duno F (1992) **Prevalencia de la tripanosomiasis bovina en la región nor-oriental del estado Falcón.** Trabajo de grado MSc. Universidad Central de Venezuela. 152pp.
 33. Eleizalde MC, Reyna-Bello A (2004) **Seroprevalencia de anaplasmosis y tripanosomosis en bovinos.** En: Rey C, Gonzatti MI, Perrone T (eds) I Simposio Internacional y II Simposio Nacional Hemoparásitos y sus Vectores. Universidad Simón Bolívar, Caracas, p.66.

34. Espinoza E, González N, Perrone T, Aso PM, Hidalgo L, Barasarte L (1999) **Aplicación de ensayo inmunoenzimático (ELISA-AC/T. evansi) para detección de anticuerpos anti *Trypanosoma vivax* en el estado Bolívar.** Veterinaria Tropical 24(1):47-53.
35. Fairchild GB (1969) **Notes on neotropical Tabanidae. XII. Classification and distribution, with keys to genera and subgenera.** Archivos de Zoología 17(4):199-255.
36. Fairchild GB, Ortiz I (1955) **Algunos Tabanidae del Bajo Orinoco, Venezuela.** Novedades científicas del museo de historia natural La Salle 16:1-7.
37. Finelle P, Lacotte R (1963) **Action trypanocide de deux sels d'Isometamidium.** Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux 16:405-411.
38. Foil LD (1983) **A mark-recapture method for measuring effects of spatial separation of horses on tabanid (Diptera) movement between hosts.** Journal of Medical Entomology 20(3):301-305.
39. Foil LD (1989) **Tabanids as vectors of disease agents.** Parasitology Today 5(3):88-96.
40. Foil LD, Hogsette JA (1994) **Biology and control of tabánidos, stable flies and horn flies.** Scientific and technical review - International Office of Epizootics 13(4):1125-1158.
41. French FE, Kline DL (1989) **1-Octen-3-ol, an effective attractant for Tabanidae (Diptera).** Journal of Medical Entomology 26:459-461.
42. García F, Alfaro C, Reyna-Bello A, Coronel R, Rangel A (2008) **Caracterización de un brote de Tripanosomosis en un rebaño bovino de ceba del estado Monagas.** En: Memorias del XIV Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Revista Científica, FCV - LUZ, p.503.
43. García HA, Rangel-Rivas A, Contreras I, García ME, García F, Perrone T (2009) **Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela.** Revista Científica, FCV-LUZ 19(3):230-237.
44. García-Pérez H. (2000) **Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia.** Universo Diagnóstico 1(2):31-41.

45. Gobierno en línea. Centro Nacional de Tecnologías de Información CNTI. En: **Estado Apure**. Disponible desde internet en: http://www.gobiernoenlinea.ve/venezuela/perfil_apure.html. [Con acceso el 13 jul 2009].
46. Gómez LB, Zavala Y (2003) **Los tábanos (Diptera: Tabanidae) del Museo de Entomología Dr. Rodolfo Bastidas, UNEFM, estado Falcón**. En: XVIII Congreso Venezolano de Entomología. p.202.
47. Gómez-P LM, Uribe SI (2007) **Preservación y almacenamiento de ADN de mariposas utilizando papel filtro**. Revista Colombiana de Entomología 33(2):197-199.
48. González J, Meléndez R (2007) **Seroprevalencia de la tripanosomosis y anaplasmosis bovina en el Municipio Juan José Mora del estado Carabobo, Venezuela, mediante la técnica de ELISA**. Revista Científica, FCV-LUZ 17(5):449-455.
49. Hall T (2013) **BioEdit**. Versión 7.2.5. Ibis Biosciences. Carlsbad, Estados Unidos. Disponible para descarga gratuita desde internet en: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>. [Con acceso el 13 abr 2014].
50. Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammere C, Jansen van Vuuren B, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (2012) **Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes**. Comptes Rendus Biologies 335:32-50.
51. Van Hennekeler K, Jones RE, Skerratt LF, Fitz LA, Reid SA, Bellis GA (2008) **A comparison of trapping methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia**. Medical and Veterinary Entomology 22:26-31.
52. Henriques AL, Krolow TK, Rafael JA (2012) **Corrections and additions to Catalogue of Neotropical Diptera (Tabanidae) of Coscarón & Papavero (2009)**. Revista Brasileira de Entomologia 56(3):277-280.
53. Hoare CA (1972) **The trypanosomes of mammals. A zoological monographs**. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh. 729pp.
54. Holdridge LR (1967) **Life Zone Ecology**. Tropical Science Center, San José, Costa Rica. 206pp.
55. Hribar LJ, Leprince DJ, Foil LD (1991) **Desing for a canopy trap for collecting horse flies (Diptera:Tabanidae)**. Mosquito Systematics 23(2):657-659.

56. I. Stanimirova I, Walczak B, Massart DL, Simeonov V, Saby CA, Di Crescenzo E (2004) **STATIS, a three-way method for data analysis. Application to environmental data.** Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems 73:219-233.
57. International Laboratory for Research on Animal Diseases. (1991). En: **Annual Report of the International Laboratory for Research on Animal Diseases.** Susan MacMillan (Ed). Disponible desde internet en; http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/Illrad90/Trypano.htm#P124_24293. [Con acceso el 16 abr 2010].
58. Janke A, Erpenbeck D, Nilsson M, Arnason U (2001) **The mitochondrial genomes of the iguana (*Iguana iguana*) and the caiman (*Caiman crocodylus*): implications for amniote phylogeny.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 268(1467):623-631.
59. Jiménez M, García J, Zambrano B (2003) **Identificación de dípteros que afectan la ganadería bovina de doble propósito y evaluación de trampas de captura en los municipios Miranda y Petit del estado Falcón.** En: XVIII Congreso Venezolano de Entomología. p.158.
60. Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, Dani VS, Bhargava A, Jannin J, Truc P (2005) **Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 73:491-495.
61. Kaminsky R, Schmid C, Lun ZR (1997) **Susceptibility of dyskinetoplastic *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to isometamidium chloride.** Parasitology Research 83:816-818.
62. Krčmar S, Hribar LJ, Kopi MJ (2005) **Response of Tabanidae (Diptera) to natural and synthetic olfactory attractants.** Journal of Vector Ecology 30(1):133-136.
63. Krinsky WL (1976) **Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera:Tabanidae).** Journal of Medical Entomology 13(3):225-275.
64. Montiel-Urdaneta NS (2008) **Origen del búfalo en Venezuela. Otra alternativa de producción de leche.** En: Asociación Venezolana de Producción Animal (ed) XIV Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad del Zulia, Maracaibo, pp.363-391.

65. Muturi CN, Ouma JO, Malele II., Ngure RM, Rutto JJ, Klaus M, Mithöfer KM, Enyaru J, Masiga DK (2011) **Tracking the feeding patterns of Tsetse flies (*Glossina* Genus) by analysis of bloodmeals using mitochondrial cytochromes genes.** PLOS ONE 6(2):doi:10.1371/journal.pone.0017284.
66. Navia-Gine WG, Loaiza JR, Miller MJ (2013) **Mosquito-Host Interactions during and after an Outbreak of Equine Viral Encephalitis in Eastern Panama.** PLOS ONE 8(12):doi: 10.1371/journal.pone.0081788
67. Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RCA, Dávila AMR (2005) **The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes.** Parasitology Research 95:186-192.
68. Njiru ZK, Makumi JN, Okoth S, Ndungu JM, Gibson WC (2004) **Identification of trypanosomes in *Glossina pallidipes* and *G. longipennis* in Kenya.** Infection, Genetics and Evolution 4:29-35.
69. Owens CB, Szalanski AL (2005) **Filter paper for preservation, storage, and distribution of insect and pathogen DNA samples.** Journal of Medical Entomology 42(4):709-711.
70. Pape T, Thompson FC (Eds). (2013) **Systema Dipteriorum.** Version 1.5. Disponible desde internet en: <http://www.diptera.org/FamilyTables.php>. [Con acceso el 11 ago 2015].
71. Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M (2000) **Species identification by means of the cytochrome b gene.** International Journal of Legal Medicine 114:23-28.
72. Pechuman LL (1942) **Lista provisional de los tabánidos de Venezuela.** Boletín de Entomología Venezolana 1(3):51-58.
73. Pechuman LL, Teskey HJ (1981) **Tabanidae.** En: McAlpine JF, Wood DM (eds) Manual of Nearctic Diptera, Volume 1. Canadian Government Publishing Centre, pp.463-478.
74. Perrone T (1992) **Variación antigénica en un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*.** Trabajo de grado MSc. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. p.114.
75. Perrone T (2003) **Tipificación de aislados venezolanos de *Trypanosoma evansi*.** Tesis PhD. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela. 178pp.
76. Perrone T, Lesseur C, Reveron I, Espinoza E, Aso PM (1991) **Análisis seroepidemiológico de la tripanosomiasis bovina en la zona de Santa María de Ipire.** Acta Científica Venezolana 42(1):203.

77. Rangel-Rivas A, Mijares A (2013) **Seroprevalencia de tripanosomiasis animal en regiones ganaderas de Venezuela entre 2005 y 2013**. En: XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador, p.98.
78. Rangel-Rivas A, Mijares A (2013) **Estandarización de la técnica de PCR para determinación de *Trypanosoma evansi* en tabánidos (Diptera: Tabanidae) alimentados experimentalmente**. XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología.
79. Rivera M, García F, León J, Albers M, Garmendia J, García HA (2001) **Infecciones activas por *Trypanosoma vivax* en rebaños bovinos de Venezuela**. Jornal Brasileiro de Patologia Suplemento XV Congreso Latinoamericano de Parasitología 37(4):40.
80. Rivera MA (1996) **Hemoparasitosis Bovinas**. CDCH-UCV, Caracas. pp.15-84
81. Roberts RH (1976) **The comparative efficiency of six trap types for the collection of Tabanidae (Diptera)**. Mosquito News 36(4):530-535.
82. Roberts RH (1977) **Attractancy of two black decoys and CO₂ to tabanids (Diptera: Tabanidae)**. Mosquito News 37(2):169-172.
83. Roschman-González A, Alcázar W, Linares N, Rojas N, Jones E, Barroeta M, Rey C, Carrero L, García V, Perrone T (2006) **Seroprevalencia de tripanosomosis bovina en explotaciones extensivas del estado Apure, Venezuela**. En: LVI Convención Anual. Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, UDO-Cumaná, p.472.
84. Saif R, Wasim M, Babar ME (2012) **Molecular phylogeny of Pakistani riverine buffalo based on genetic variability of mitochondrial cytochrome b gene**. Molecular Biology Reports 39:9707–9714.E
85. Sánchez E, Perrone T, Recchimuzzi G, Cardozo I, Biteau N, Aso PM, Mijares A, Baltz T, Berthier D, Balzano-Nogueira L, Gonzatti MI (2015) **Molecular Characterization and classification of *Trypanosoma* spp. venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplast maxicircle genes**. Parasites & Vectors 8(1):536. doi: 10.1186/s13071-015-1129-2. Erratum: Parasites & Vectors, 2015; 8(1):566. doi: 10.1186/s13071-015-1177-7.
86. Sandoval E, Espinoza E, González N, Morales G, Montilla W, Jiménez D (1998) **Encuesta serohematológica en bovinos tripanosusceptibles de**

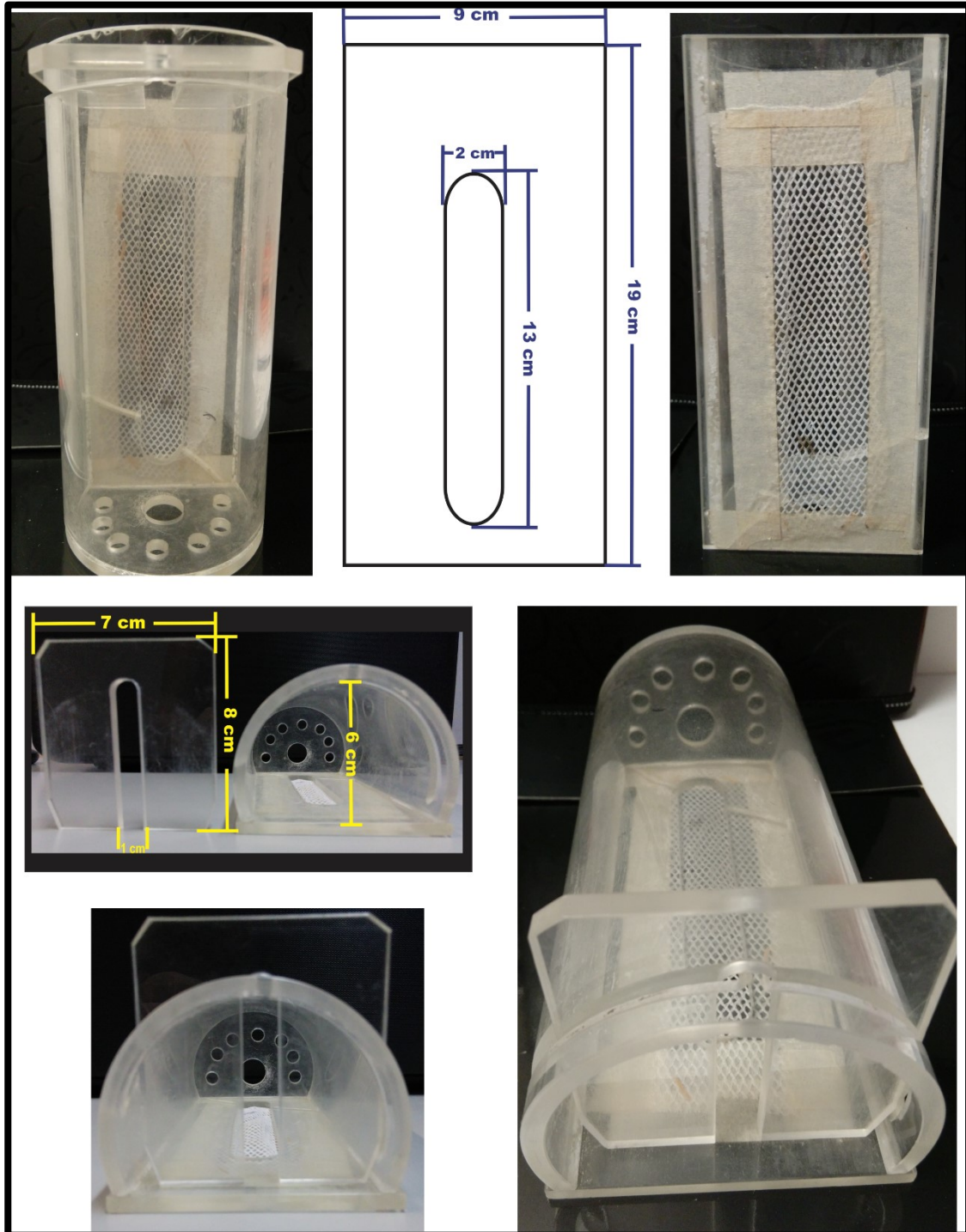
- dos unidades agroecológicas del Valle de Aroa.** Revista Científica, FCV-LUZ 8(3):253-258.
87. Shegokar VR, Powar RM, Joshi PP, Bhargava A, Dani VS, Katti R, Zare VR, Khanande VD, Jannin J, Truc P (2006) **Short report: human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: preliminary serologic survey of the local population.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 75(5):869–870.
 88. Sheldon FH, Jones CE, McCracken KG (2000) **Relative patterns and rates of evolution in heron nuclear and mitochondrial DNA.** Molecular Biology and Evolution 17(3):437–450.
 89. Siegel-Causey D (1997) **Phylogeny of the Pelecaniformes: molecular systematics of a privative group.** En: Mindell DL (Ed). Avian molecular evolution and systematics. University of Nebraska, Nebraska, pp.159-171.
 90. Silva-Iturriza A, Nassar JM, García-Rawlins AM, Rosales R, Mijares A (2013) ***Trypanosoma evansi* kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae), support the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America.** Parasitology International 62:95-99.
 91. Simoes D, Sánchez M, González Y, Rivera F, Parra R, Gil M, García ME, Quijada JJ, García F (2009) **Brote de tripanosomosis en un rebaño doble propósito del municipio Mara del estado Zulia, Venezuela.** Ciencia 17(2):124-132.
 92. Soulsby E.J.L. (1987) **Parasitología y Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos.** Nueva Editorial Interamericana s.a, México. pp.521-551.
 93. Steuber S, Abdel-Rady A, Clausen PH (2005) **PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae).** Parasitology Research 97:247-254.
 94. Stevens J., Brisse S (2004) **Systematic of trypanosomes of medical and veterinary importance.** En: Maudlin I, Holmes PH, Miles MA (eds) The Trypanosomiasis. CABI Publishing, pp.1-23.
 95. Stone A (1944) **Some Tabanidae from Venezuela.** Boletín de Entomología Venezolana 3(3):125-138.
 96. Suárez C, García F, Meléndez R (2004) **Prevalencia de tripanosomiasis bovina en la región ganadera de Tucacas, Municipio José Laurencio**

- Silva, Estado Falcón Venezuela.** En: Rey C, Gonzatti MI, Perrone T (eds) I Simposio Internacional y II Simposio Nacional Hemoparásitos y sus Vectores. Universidad Simón Bolívar, Caracas, p.65
97. Suárez C, García F, Román D, Coronado A, Perrone T, Reyna A (2009) **Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela.** Zootecnia Tropical 27(4):363-372.
 98. Tamasaukas R, Aguirre A, Ron J, Roa N, Cobo M (2000) **Tetralogía hemoparasitaria en algunas fincas bovinas del municipio Santa Rita, estado Guárico, Venezuela.** Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV 41(4):101-108.
 99. Tamasaukas R, Purroy R, Rodríguez HC, Ruiz I, Roa N, Labrador C (2002) **Seroprevalencia de tripanosomiasis y brucelosis bovina en fincas integradas a la producción de maíz, de la zona alta de los municipios Roscio y Ortiz, estado Guárico, Venezuela.** Revista Científica, FCV-LUZ 12(2):630-634.
 100. Tamasaukas R, Roa N (1992) **Epidemiología básica agroecológica de la Trypanosomosis bovina por *T. vivax* en el estado Guárico.** Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV 38(1):143-165.
 101. Tamasaukas R, Roa N, Cobo M (2004) **Tripanosomiasis por *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalus bubalis*) en dos fincas del estado Guárico, Venezuela.** En: Rey C, Gonzatti MI, Perrone T (eds) I Simposio Internacional y II Simposio Nacional Hemoparásitos y sus Vectores. Universidad Simón Bolívar, Caracas, p.44.
 102. Tamasaukas R, Roa N, Cobo M (2006) **Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalis bubalis*), en dos fincas del estado Guárico, Venezuela.** Revista Científica, FCV-LUZ 16(6):575-578.
 103. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** Nucleic Acids Research 22(22):4673-4680.
 104. Thompson PH (1969) **Collecting methods for Tabanidae (Diptera).** Annals of the Entomological Society of America 62:50-57.
 105. Tiape-Gómez Z, Velásquez De Ríos M, Gorayeb I (2005) **Lista preliminar de Tabánidos (Diptera: Tabanidae) del Noroccidente de Guárico y Sur de Aragua, Venezuela.** Entomotrópica 20(1):75-78.

106. Tizard I (2002) **Inmunología Veterinaria**, 6ta ed. McGraw-Hill Interamericana, México. p.212.
107. Toro M (1990) **Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela**. En: Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico. Universidad Central de Venezuela-Universidad Simón Bolívar, Caracas, pp 33-49.
108. Toro M, León E, López Boyer R, García JA, Ruiz A (1980) **Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas**. Veterinaria Tropical 5(1):43-50.
109. Toro M, León E, Pallota F, López G, García J, Ruiz A (1983) **Prevalencia de las hemoparasitosis en bovinos del estado Guárico**. Veterinaria Tropical 8(1):26-36.
110. UlienberG G (1998) **A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomosis**. En: FAO Corporate Document Repository. Disponible desde internet en; <http://www.fao.org/docrep/006/x0413e/X0413E02.htm>. [Con acceso el 26 abr 2010].
111. Veer V, Parashar BD, S. P (2002) **Tabanid and muscoid haematophagous flies, vectors of trypanosomiasis or surra disease in wild animals and livestock in Nandankanan Biological Park, Bhubaneswar (Orissa, India)**. Current Science 82(5):500-503.
112. Velásquez De Ríos M, Tiapé-Gómez Z, Gorayeb I, Tamasaukas R (2004) **Abundancia estacional de tabánidos (Diptera: Tabanidae) en el sector Las Lajas, Municipio Miranda, estado Guárico, Venezuela**. Entomotrópica 19(3):149-152.
113. Woo PTK (1969) **The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood**. Canadian Journal of Zoology 42(5):921-923.
114. Yao F, Coquery J, Lê-Cao K (2012) **Independent Principal Component Analysis for biologically meaningful dimension reduction of large biological data sets**. BMC Bioinformatics 13:24-39.
115. Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) **A greedy algorithm for aligning DNA sequences**. Journal of Computational Biology 7(1-2):203-214.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Diagrama del dispositivo empleado para la alimentación experimental de tabánidos con ratas sanas e infectadas con *Trypanosoma evansi*.



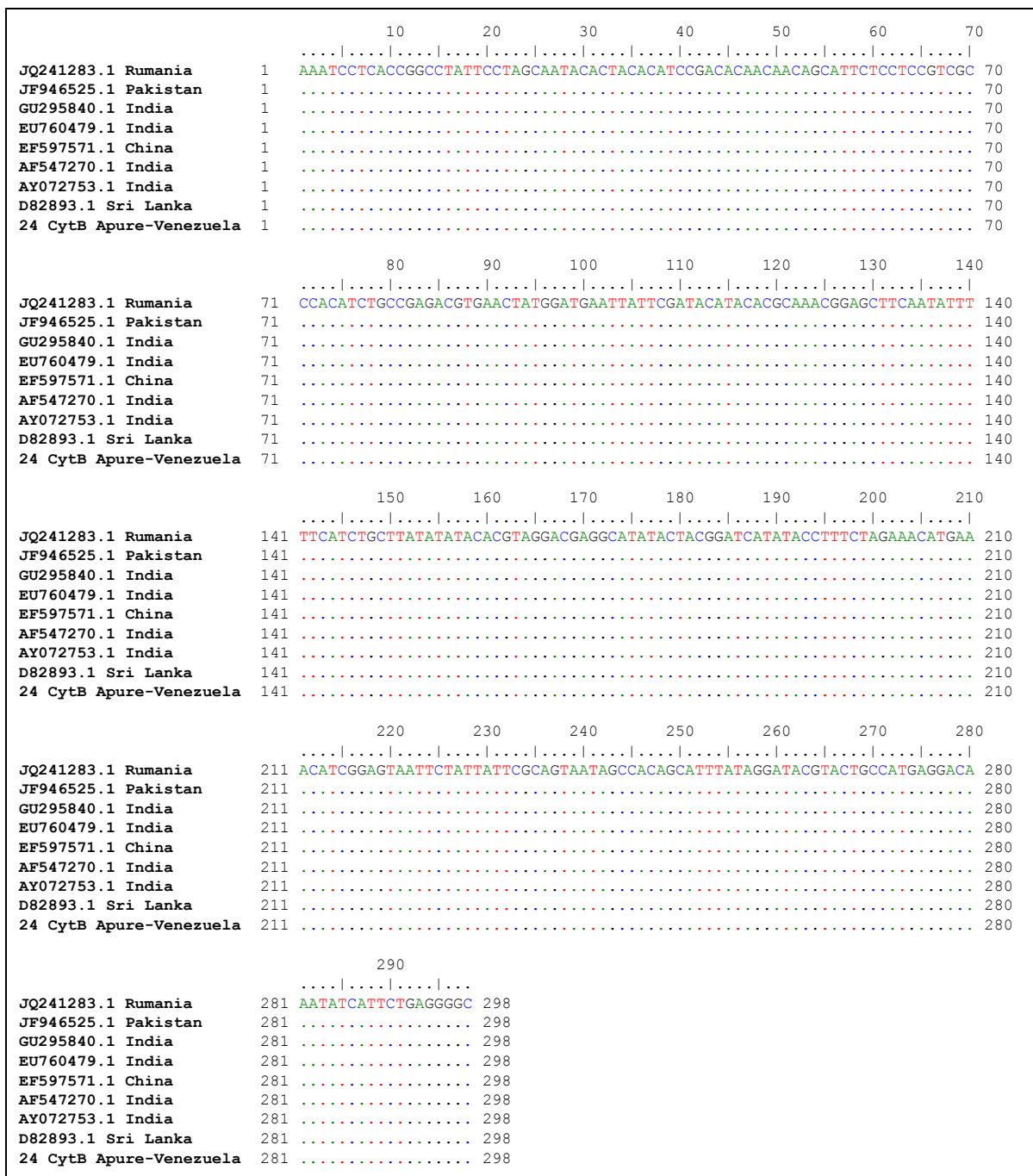
Anexo 5. **Alineamiento de secuencias de *Rattus norvegicus* (Rata gris o rata de alcantarilla):** Los aislados venezolanos muestran gran homología con un aislado de china salvo por una transición al final de la secuencia.

			10	20	30	40	50	60	70
KM657953.1 China	1							
10 CytB Apure-Venezuela	1							
65 CytB Apure-Venezuela	1							
			80	90	100	110	120	130	140
KM657953.1 China	71							
10 CytB Apure-Venezuela	71							
65 CytB Apure-Venezuela	71							
			150	160	170	180	190	200	210
KM657953.1 China	141							
10 CytB Apure-Venezuela	141							
65 CytB Apure-Venezuela	141							
			220	230	240	250	260	270	280
KM657953.1 China	211							
10 CytB Apure-Venezuela	211							
65 CytB Apure-Venezuela	211							
			290						
KM657953.1 China	281							
10 CytB Apure-Venezuela	281							
65 CytB Apure-Venezuela	281							

Anexo 6. **Alineamiento de secuencias de *Ardea alba* (garza blanca):** la secuencia obtenida en este estudio muestra dos transiciones en relación a la secuencia del GenBank proveniente de Louisiana, Texas – Estados Unidos.

			10	20	30	40	50	60	70
AF193822.1 Louisiana-EUA	1							
26 CytB Apure-Venezuela	1							
			80	90	100	110	120	130	140
AF193822.1 Louisiana-EUA	71							
26 CytB Apure-Venezuela	71							
			150	160	170	180	190	200	210
AF193822.1 Louisiana-EUA	141							
26 CytB Apure-Venezuela	141							
			220	230	240	250	260		
AF193822.1 Louisiana-EUA	211							
26 CytB Apure-Venezuela	211							

Anexo 7. Alineamiento de secuencias de *Bubalus bubalis* (búfalo): la secuencia obtenida en este estudio presentó identidad de 100% con aislados de diversas partes del mundo.



Anexo 8. **Alineamiento de secuencias de *Caiman crocodilus* (baba)**: la secuencia obtenida en este estudio presentó una transversión y una transición en relación a los hallados en GenBank, que incluye un aislado venezolano.

		10	20	30	40	50	60	70
AJ404872.2 Venezuela	1	ATCCAAATCCTCACAGGAGTATTCCTAATAATACACTTCTCACCCAGCGATACCACAGCTTTCTCATCCG	70					
JF315306.1 No especificado	1	70					
GU331894.1 India	1	70					
41 CytB Apure-Venezuela	1	70					
		80	90	100	110	120	130	140
AJ404872.2 Venezuela	71	TCGCCCTACACCTCCCCGAGGCTGTGATTTGGATGACTTATCCGAAGCTCCACACAACGGAGCCATCCAT	140					
JF315306.1 No especificado	71	140					
GU331894.1 India	71	140					
41 CytB Apure-Venezuela	71	140					
		150	160	170	180	190	200	210
AJ404872.2 Venezuela	141	CTTCTTCATATTTATTTCTCTACATATCGGACGAGGCCATATACTACGCCCTCTACTTACAGAAAACACA	210					
JF315306.1 No especificado	141	210					
GU331894.1 India	141	210					
41 CytB Apure-Venezuela	141	210					
		220	230	240	250	260	270	280
AJ404872.2 Venezuela	211	TGAAACGTTGGAGTAATCATACTATTCCTACTAATAGCCACAGCATTTCATAGGCTATGTCCTCCCATGAG	280					
JF315306.1 No especificado	211	280					
GU331894.1 India	211	280					
41 CytB Apure-Venezuela	211T.....	280					
		290	300					
AJ404872.2 Venezuela	281	GACAAATATCATTCTGAGGAGCA	303					
JF315306.1 No especificado	281	303					
GU331894.1 India	281	303					
41 CytB Apure-Venezuela	281G.....	303					

Anexo 9. Alineamiento de secuencias de *Odocoileus virginianus* (Venado de cola blanca): el aislado de este estudio presentó mayor homología con una secuencia proveniente de Guyana Francesa que con sus pares de Colombia y Estados Unidos.

		10	20	30	40	50	60	70	
JN632671.1	Guyana Francesa	1	ATCCTACAAATCTTACTGGTCTATTCC	TAGCAATACATTATACATCCGACACAATAACAGCATTTCCT					70
JN632672.1	Colombia	1T.....G.....						70
DQ673136.1	Texas-EUA	1G.....						70
30 CytB	Apure-Venezuela	1						70
		80	90	100	110	120	130	140	
JN632671.1	Guyana Francesa	71	CTGTCACTCACATCTGCCGAGACGTTAACTATGGCTGAATCATT	CGATATATACATGCCAATGGAGCATC					140
JN632672.1	Colombia	71C.....						140
DQ673136.1	Texas-EUA	71C.....C.....						140
30 CytB	Apure-Venezuela	71						140
		150	160	170	180	190	200	210	
JN632671.1	Guyana Francesa	141	CATATTCCTTTATCTGCCTATTCATACATGTAGGACGAGGACTATACTACGGATCCTATACCTTCTTAGAA						210
JN632672.1	Colombia	141T.....T.....G.....T.....A.....						210
DQ673136.1	Texas-EUA	141T.....C.....G.....A.....						210
30 CytB	Apure-Venezuela	141						210
		220	230	240	250	260	270	280	
JN632671.1	Guyana Francesa	211	ACATGAAACATTGGAGTAATTCTCCTATTCACAGTTATAGCCACAGCATTCGTAGGGTACGTCC	TACCAT					280
JN632672.1	Colombia	211						280
DQ673136.1	Texas-EUA	211T.....						280
30 CytB	Apure-Venezuela	211						280
		290	300						
JN632671.1	Guyana Francesa	281	GAGGACAGATATCATTCTGAGGGGCAA						307
JN632672.1	Colombia	281G.....						307
DQ673136.1	Texas-EUA	281G.....						307
30 CytB	Apure-Venezuela	281A.....						307

Anexo 10. Trabajo publicado en revista científica en el marco de esta tesis doctoral.

Ariadna Rangel-Rivas, Francia Reyes y Alfredo Mijares. **Seroprevalencia de tripanosomosis bovina determinada por ELISAI posterior al tratamiento profiláctico con isometamidium en un hato del municipio Muñoz del estado Apure.** Septiembre – Octubre 2012 – Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias – LUZ. Vol. XXII (5): 405-409.

Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXII, N° 5, 405 - 409, 2012

SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA DETERMINADA POR ELISAI POSTERIOR AL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON ISOMETAMIDIUM EN UN HATO DEL MUNICIPIO MUÑOZ DEL ESTADO APURE

Seroprevalence of Bovine Trypanosomosis Determined by ELISAI Post Prophylactic Isometamidium Treatment in a Farm at Muñoz County, Apure State, Venezuela

Ariadna Rangel-Rivas¹, Francia Reyes² y Alfredo Mijares^{1}*

¹Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Centro de Bioquímica y Biofísica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Carretera Panamericana, Km. 11. 20632. Caracas 1020A, Venezuela.

²Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos, Universidad Simón Bolívar. Baruta 1086, Venezuela.

Tel: 58 212 5041853 Fax: 58 212 5041093. amijares@ivic.gob.ve / mijaresa@gmail.com

RESUMEN

La tripanosomosis bovina genera anualmente cuantiosas pérdidas económicas en la producción ganadera del país. Algunas explotaciones de tipo extensivo han establecido planes anuales de control de estos hemoparásitos, los cuales consisten en la aplicación profiláctica de fármacos tripanocidas. Con la finalidad de evaluar la variación de la seroprevalencia de *Trypanosoma* spp. después de una aplicación de clorhidrato de cloruro de isometamidium al 2%, fueron muestreados un grupo de 513 novillas *Bos indicus* Linnaeus, 1758, en un hato ganadero del municipio Muñoz del estado Apure, Venezuela. Se realizaron cuatro muestreos equidistantes en un período de nueve meses. Una semana antes de la primera toma de muestras se le aplicó a cada uno de los animales una dosis de 1 mg/kg del compuesto. Una vez en el laboratorio, las muestras de suero sanguíneo fueron analizadas mediante ensayos de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA), de tipo indirecto, empleando como antígeno un extracto purificado de *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). Los ensayos fueron realizados según protocolo estandarizado previamente en el laboratorio. Se obtuvieron los siguientes porcentajes de seroprevalencia: 75,60% (diciembre 2009), 57,60% (marzo 2010), 41,60% (junio 2010) y 53,40% (septiembre 2010). Los resultados mostraron una alta seroprevalencia de tripanosomosis al momento de aplicar el tratamiento profiláctico, la cual fue disminuyendo en

los meses sucesivos para luego sufrir un ligero aumento, posterior a los seis meses de la aplicación de tratamiento, sin embargo, no se registraron casos clínicos de la enfermedad, ni la presencia del parásito mediante pruebas diagnósticas directas. Se recomienda continuar con la evaluación periódica de los animales y considerar como una medida sanitaria preventiva la rotación del compuesto activo empleado.

Palabras clave: Tripanosomosis, profilaxis, seroprevalencia, ELISA, isometamidium.

ABSTRACT

Bovine trypanosomosis generates annual economic losses in livestock production in the country. Some farms that have an extensive cattle production, have established a control annual plan of hemoparasites which involve the application of prophylactic trypanocidal drugs. In order to evaluate the variation of seroprevalence after an annual application of isometamidium chloride hydrochloride 2%, were sampled a group of 513 heifers of *Bos indicus* Linnaeus, 1758, in a herd of Muñoz County of Apure State, Venezuela. Four samples were carried out in an equally spaced over a period of nine month. A week before the first sampling was applied to each animal a dose of 1 mg/kg of the drug. Once at the laboratory, samples were analyzed by ELISA indirect testing using as antigen a purified extract of *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885). The test was performed according to previously standardized protocol in the laboratory. The seroprevalence obtained for the different samples studied were expressed as percentages of positive ani-

Recibido: 01 / 02 / 2012. Aceptado: 20 / 04 / 2012.

imals: 75.60% (December 2009), 57.60% (March 2010), 41.60% (June 2010) and 53.40% (September 2010). The results showed a high seroprevalence when prophylactic treatment was applied, which was decreasing in the following months and then suffer an light increase, after six months of treatment application, however, no cases of clinical disease or the presence of the parasite by direct diagnostic tests were observed. It is recommended, to continue with regular assessment of animals and considered as a preventive health measure the rotation of the active compound employed.

Key words: Trypanosomosis, prophylaxis, seroprevalence, ELISA, isometamidium.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis bovina, conocida comúnmente como secadera, huequera o cacho hueco [9] es una enfermedad parasitaria producida por *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* Ziemann, 1905, que afecta a bóvidos (Bovidae: Artiodactyla) rumiantes de rebaños vacunos (*Bos taurus* y *B. indicus* Linnaeus, 1758), bufalinos (*Bubalus bubalis* Kerr, 1792), ovinos (*Ovis* spp. L., 1758) y caprinos (*Capra* spp. L., 1758). Los signos clínicos que presentan los animales afectados por tripanosomosis son muy similares a los observados en cualquier enfermedad provocada por otros agentes hemotrópicos o en enfermedades que cursen con estados febriles intermitentes, decaimiento, pérdida de peso, disminución de la producción y aumento de secreción glandular (principalmente de las glándulas lagrimales), entre otros. Por lo tanto, la experiencia del veterinario a cargo y las pruebas de laboratorio son importantes a la hora de realizar el diagnóstico correspondiente y establecer programas de tratamiento y control de esta enfermedad.

El tratamiento curativo, en casos agudos y crónicos de la enfermedad, va dirigido a la eliminación del parásito, mediante la administración de drogas tripanocidas, como: diminazeno, quinapiramide y fenantridinas y a dar soporte al animal afectado mediante agentes terapéuticos que produzcan un aumento del número de eritrocitos y/o de la concentración de hemoglobina en estas células (E), hierro y vitaminas del complejo B), fluidoterapia y buena alimentación. Por otra parte, cuando el patógeno produce casos de infección subaguda, manteniéndose de manera enzoótica en el rebaño se suele implementar el uso de drogas tripanocidas de forma profiláctica, principalmente quinapiramide y fenantridinas. Sin embargo, su uso prolongado ha dado paso a la supervivencia de cepas resistentes [9, 1]. De estas drogas, el isometamidium es un derivado de fenantridina, cuyo mecanismo de acción no se conoce en su totalidad, pero se cree que inhibe selectivamente la enzima topoisomerasa II del kinetoplasto [5], impidiendo así el correcto desenrollamiento de las hebras de ADN y provocando rupturas descontroladas de las mismas por aumento de la tensión. En estudios previos realizados en novillos, el clorhidrato de cloruro isometamidium demostró tener acción tanto curativa, elimi-

nando eficazmente los tripanosomas circulantes, como preventiva hasta 4 meses después de la aplicación intramuscular. Sin embargo, los autores recomiendan reservar su uso sólo para tratamientos curativos en virtud de la rapidez con que se observa la aparición de cepas de *T. congolense* y *T. vivax* resistentes al fármaco [1].

El diagnóstico de infecciones activas por tripanosomas se basa en técnicas parasitológicas de observación directa al microscopio óptico, tales como: observación de sangre fresca, técnica de microcentrifugación capilar (TMC), frotis sanguíneo de gota gruesa y frotis de capa blanca, teñidos comúnmente con solución de Giemsa al 10% o Hemacolor® [11]. Estos métodos son ampliamente utilizados bajo condiciones de campo, a pesar de su bajo porcentaje de detección del parásito [3], al requerir de una infección activa al momento de la toma de muestra. Las pruebas de diagnóstico serológico realizadas en laboratorio aportan mejor información sobre la situación del rebaño, ya que permiten detectar niveles de anticuerpos circulantes contra el parásito en el suero sanguíneo, indicativos de infección activa o reciente, como en el caso del ELISA indirecto [10, 11].

En virtud del impacto negativo que ejerce este hemoparásito sobre la producción pecuaria en Venezuela, la presente investigación fue realizada con el objetivo de evaluar la variación de la seroprevalencia de *Trypanosoma* spp., a través de ELISA indirecto, en un grupo de novillas monitoreadas trimestralmente a lo largo de nueve meses luego de la aplicación del medicamento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue llevado a cabo en un hato de cría y levante de ganado cebú, ubicado en el municipio Muñoz del estado Apure, situado aproximadamente a 15 Km al sur de la población de Bruzual, del mismo estado (7°49'03"N 69°17'31"O). La FIG. 1 muestra la ubicación relativa del hato. La zona endémica fue seleccionada por estudios previos realizados en 2006, donde Roschman-González y col. [10] determinaron una alta seroprevalencia de *Trypanosoma vivax* (74,59%). La zona se compone de una gran llanura de sabanas inundables en época de lluvia, sin relieves significativos y con variaciones climáticas menores. La temperatura oscila entre 23 y 33°C, según promedio de los registros del hato desde 2006 hasta 2010, y la altitud entre 0 y 90 msnm.

Se seleccionó el grupo comprendido por la totalidad de novillas del hato (n=513), debido a su relativamente accesible ubicación en un potrero de 1.409 ha; donde permanecieron sin rotación durante todo el estudio.

Empleando agujas 21G × 1 1/2" y tubos Vacutainer™ sin anticoagulante, las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cocárdica, en cuatro momentos durante el estudio: diciembre del 2009, marzo, junio y septiembre del 2010. Se colectaron adicionalmente muestras en tubos Vacutainer™ con anticoagulante para la realización de extendidos

sanguíneos y microcentrifugación capilar (aproximadamente el 10% de las novillas de cada muestreo). La FIG. 2 muestra los totales de animales muestreados en cada oportunidad, pues a pesar de tratarse de las mismas 513 novillas no fue posible en ninguna oportunidad recoger la totalidad del grupo del potrero. Todas las novillas fueron tratadas una semana antes de la primera toma de muestra con 1 mg de dorhidrato de doruro de isometamidium al 2% por kilogramo de peso vivo; debido a manejo sanitario del hato no se estableció un grupo de animales control (no tratado). Las muestras de sangre se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas, se centrifugaron por espacio de 5 minutos a 5000 rpm y los sueros obtenidos se transvasaron a tubos Eppendorf® con capacidad para 1,5 mL, se trasladaron refrigerados en cava con hielo hasta el laboratorio donde se mantuvieron a -20°C en un congelador vertical hasta la realización del ELISA.

El antígeno fue obtenido de extracto purificado de *T. evansi*, expandido en ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) de la línea Sprague Dawley, según el método descrito por Perrone [7]. Se estandarizaron las condiciones para la realización del ELISA indirecto: 1000 ng totales de antígeno por cada 100 μL (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$), diluido en solución tampón carbono bicarbonato 0,05M pH 9,6 (BCB). Solución de bloqueo a base de leche descremada en polvo diluida al 5% en solución tampón fosfato salino 0,2M pH 7,2 (PBS). Dilución 1:100 de cada suero problema y controles positivos y negativos en PBS y Tween 20 al 0,1%. Dilución 1:10000 del anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de bovino conjugado a peroxidasa (anti-bovine IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, EUA) y 30 minutos de exposición al cromógeno revelador 2,2'azino bis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) al 2% (ABTS, Sigma).



FIGURA 1. MAPA POLÍTICO DEL ESTADO APURE SEÑALANDO LA UBICACIÓN APROXIMADA DEL LUGAR DE MUESTREO.

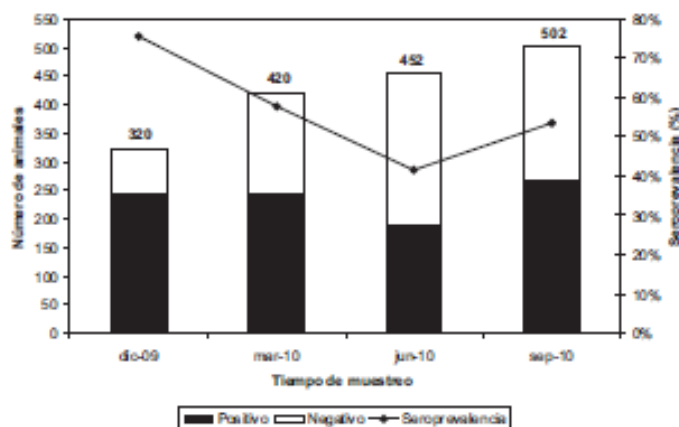


FIGURA 2. NÚMERO DE ANIMALES POSITIVOS VS. NEGATIVOS Y PORCENTAJE DE PREVALENCIA EN RELACIÓN CON LA POBLACIÓN MUESTREADA TRIMESTRALMENTE.

Fueron utilizados dos sueros positivos y tres sueros negativos, por duplicado en cada placa, tomados al azar de una seroteca constituida por muestras de bovinos colectadas en diversas zonas del país, probadas previamente mediante la misma técnica de ELISA y confirmadas por western blot.

Para los ensayos, 100 µL del antígeno diluido fue agregado a cada pozo de placas de polivinilo (Inmunolon® de 96 pozos, fondo U), exceptuando cuatro pozos destinados a funcionar como blancos (sin antígeno) y dos para control de la solución tampón (suero de bovino diluido 1:100 en BCB); cada placa se mantuvo en cámara húmeda por 12 horas a 4°C. Se realizaron 3 lavados con solución de cloruro de sodio 1,5 M y Tween 20 al 1%. Se agregaron 200 µL de solución de bloqueo, se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora y se descartó por inversión, sin lavar la placa. Se agregaron 100 µL de cada suero problema diluido y de cada control, éstos últimos por duplicado, se dejaron reposar bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo y se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 µL del anticuerpo secundario, se incubó y lavó de igual forma. Se agregaron 100 µL del cromógeno y se colocó la placa en agitación suave durante 30 min, a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la densidad óptica a una longitud de 405 nm, en un espectrofotómetro Tecan Sunrise-Basic (Grödig, Austria).

Los valores de los controles blancos obtenidos en cada placa fueron promediados y restados al resto de los valores. Los puntos de corte (PC) para determinar la positividad o negatividad de cada muestra se establecieron calculando el promedio de los tres controles negativos por duplicado más tres desviaciones estándar [10]. La prevalencia relativa se expresó en base al porcentaje ajustado de individuos positivos y negativos para cada muestreo y se analizó empleando el programa estadístico MedCalc mediante pruebas de Ji cuadrado con intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En diciembre del 2009 fue muestreado un total de 320 animales del grupo de 513 novillas, de las cuales 242 (75,6%) mostraron seropositividad a *Trypanosoma spp.* y 78 (24,4%) fueron negativas (PC=0,184). Para marzo del 2010 se tomaron 420 muestras del mismo grupo, resultando 242 (57,6%) positivas y 178 (42,4%) negativas (PC=0,400). En junio del 2010 el total de muestras obtenidas ascendió a 452 con 188 (41,6%) positivas y 264 (58,4%) negativas (PC=0,446). Mientras que para el último muestreo, en septiembre del mismo año, se alcanzó a muestrear casi la totalidad del grupo de novillas, colectando 502 muestras, donde 268 (53,4%) fueron positivas y 234 (46,6%) negativas (FIG. 2). La disparidad observada en la población (n) de cada muestreo obedece a manejos propios del hato y condiciones climáticas particulares de cada época del año, que no permitieron recoger todos los animales en los días seleccionados

para las tomas de muestras, sin embargo los valores se ajustaron a porcentaje eliminando así las diferencias.

Al comparar, estadísticamente, los valores obtenidos mediante pruebas de Ji cuadrado, se observó diferencia significativa entre los muestreos de diciembre-2009 y marzo-2010 ($P<0,0001$), entre los muestreos de marzo-2010 y junio-2010 ($P<0,0001$), igualmente entre junio-2010 y septiembre-2010 ($P=0,0003$). Considerando que entre los últimos dos muestreos se incrementó la seroprevalencia se puede concluir que el medicamento fue perdiendo su efectividad a medida que se alejó del momento de su aplicación. Además se pudo observar una diferencia altamente significativa (22,2%) entre el muestreo inicial de diciembre-2009 y el final realizado en septiembre-2010 ($P<0,0001$), por lo que se puede considerar beneficiosa la medida sanitaria aplicada, aunque no del todo efectiva.

En la FIG. 2 se puede apreciar, las proporciones entre animales positivos (negro) y negativos (blanco) por muestreo y el comportamiento de la seropositividad a *Trypanosoma spp.* durante el estudio, la cual mostró una disminución progresiva hasta los seis meses posteriores a la aplicación del tratamiento, para luego incrementarse nuevamente. Estos resultados coinciden con las recomendaciones de los laboratorios que elaboran la droga, que señalan una efectividad de dos a seis meses, dependiendo de la cepa de tripanosoma involucrada.

Un hallazgo de interés en este estudio fue la comprobación del alto porcentaje de bovinos seropositivos a tripanosoma en campo; aunque no se registró ningún caso clínico y/o crónico, y tampoco se logró demostrar la presencia del parásito mediante las pruebas directas que se realizaron a una proporción del grupo de novillas. Se observa entonces que estos animales desarrollan infecciones subclínicas que favorecen la permanencia del parásito en la zona. Cabe destacar que los resultados de este estudio concuerdan con investigaciones realizadas en otros estados del país; por ejemplo, en Guárico, se reporta una seroprevalencia para tripanosomosis de 60% (n=193) en tres fincas de los municipios Roscio y Ortiz [12]. Sin embargo, en infecciones naturales es común encontrar seroprevalencias diferentes entre los diversos estudios que se realizan o en un mismo estudio que abarque distintas zonas de muestreo. González y Meléndez [4] reportaron para el estado Carabobo, seroprevalencias entre 50 y 60%, para los sectores El Charal, Anca y San Pablo, mientras para los sectores Canoabito, Alpargatón y Río Abajo sólo obtuvieron valores entre 10 y 15%. Se observó entonces que la prevalencia de la enfermedad puede verse afectada por factores inherentes al Estado, dependientes de la geografía particular de la zona o, inclusive, entre hatos cercanos o vecinos, debido principalmente a manejos propios de cada sistema productivo, tales como planes sanitarios, control de vectores, etc.

A través de un estudio de dinámica estacional de vectores que se llevó simultáneamente en el hato se pudo observar

que los animales evaluados estuvieron expuestos a la picadura de moscas hematófagas de la familia Tabanidae durante todo el año. Según resultados parciales de los muestreos entomológicos mensuales realizados en la misma zona de pastoreo de este grupo de novillas, fueron colectados un total de 1.299 ejemplares entre noviembre-2009 y mayo-2010 [8]. Datos (no publicados) registrados posteriormente mostraron que la actividad de tabánidos se incrementó cerca de 86% entre junio y noviembre de 2010, colectándose un total de 7.834 ejemplares durante ese período. Esta alta densidad de vectores sugiere que pudieran estar involucrados en la transmisión mecánica de tripanosomas en el área de estudio, tal como ha sido demostrado previamente en estudios sobre transmisión mecánica [2, 6].

A su vez, esta alta población de insectos hematófagos puede estar relacionada a factores agroecológicos que favorecen su ciclo de vida, como la abundante y cerrada vegetación presente en los bosques de galería y las amplias zonas inundables, que se mantienen anegadas inclusive varios meses después de la finalización de la temporada lluviosa.

CONCLUSIONES

El medicamento evaluado demostró ser medianamente efectivo para disminuir la prevalencia de tripanosomosis en los animales sólo durante los primeros seis meses. Por lo que sería recomendable como medida correctiva la rotación con otros principios activos para controlar la prevalencia; por ejemplo la aplicación de un fármaco del tipo diminazeno. Igualmente se recomienda continuar el monitoreo de la tripanosomosis, considerando que durante toda la investigación se observó una alta seroprevalencia contra tripanosoma ($\geq 41,6\%$).

Los resultados obtenidos representan un importante aporte al mostrar el comportamiento de infecciones por tripanosoma en bovinos, bajo condiciones naturales de explotación en Venezuela, una vez se aplica una medida sanitaria para su control.

También se observó que altos niveles de parasitemia sumados a los altos niveles poblacionales de tabánidos y otros dípteros hematófagos, podrían estar favoreciendo la transmisión mecánica del parásito. Sin embargo, se requieren estudios complementarios para determinar el papel que juegan en la epizootiología de ésta y otras enfermedades meta-zoonóticas.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación contó con el financiamiento del FONACIT a través del proyecto Misión Ciencia 2007-001425. Los autores agradecen su valiosa colaboración a la directiva y el personal de Agropecuaria Flora C.A. y ANACENT C.A.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FINELLE, P.; LACOTTE, R. Action trypanocide de deux sels d'isometamidium. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 16:405-411. 1963.
- [2] FOIL, L. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol. Today.* 5(3):88-96. 1989.
- [3] GARCÍA, H.; RANGEL-RIVAS, A.; CONTRERAS, I.; GARCÍA, M.E.; GARCÍA, F.; PERRONE, T. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* XIX (3):230-237. 2009.
- [4] GONZÁLEZ, J.R.; MELÉNDEZ, R.D. Seroprevalencia de la tripanosomosis y anaplasmosis bovina en el municipio Juan José Mora del estado Carabobo, Venezuela, mediante la técnica de ELISA. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* XVI (5):449-455. 2007.
- [5] KAMINSKY, R.; SCHMID, C.; LUN, Z.R. Susceptibility of dyskinetoplastic *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to isometamidium chloride. *Parasitol. Res.* 83: 816-818. 1997.
- [6] KRINSKY, W.L. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *J. Med. Entomol.* 13(3): 225-275. 1976.
- [7] PERRONE, T.M. Variación antigénica en un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*. Universidad Simón Bolívar. Tesis de Grado. Caracas, Venezuela. 114 pp. 1992.
- [8] RANGEL-RIVAS, A.; MUJARES, A. Fluctuación poblacional de tabánidos (Diptera: Tabanidae) en un hato de los llanos venezolanos. *7th International Congress of Dip-terology.* San José. 08/8-13. Costa Rica. 272 pp. 2010.
- [9] RIVERA, M.A. Tripanosomiasis. *Hemoparasitosis Bovinas.* CDCH-UCV. Pp. 15-84. 1996.
- [10] ROSCHMAN-GONZÁLEZ, A.; ALCÁZAR, W.; LINARES, N.; ROJAS, N.; JONES, E.; BARROETA, M.; REY, C.; CARRERO, L.; GARCÍA, V.; PERRONE, T.M. Seroprevalencia de tripanosomosis bovina en explotaciones extensivas del estado Apure, Venezuela. *LVI Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC).* Universidad de Oriente, Núcleo de Cumaná. 11/ 19-24. Venezuela. 472 pp. 2006.
- [11] SOULSBY, E.J.L. Protozoa. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.* Nueva Editorial Interamericana S.A. México. Pp 521-551. 1987.
- [12] TAMASOUKAS, R.; PURROY, R.; RODRÍGUEZ, H.C.; RUIZ, I.; ROA A.N.; LABRADOR, C. Seroprevalencia de tripanosomiasis y brucelosis bovina en fincas integradas a la producción de maíz, de la zona alta de los municipios Roscio y Ortiz, estado Guárico, Venezuela. *Rev. Científ. FCV-LUZ.* XII (Suplemento 2):630-634. 2002.

Anexo 12. Trabajos publicados en congresos en el marco de esta tesis doctoral.

Rangel-Rivas Ariadna y Mijares, Alfredo. **Fluctuación poblacional de tabánidos (Diptera: Tabanidae) en un hato de los llanos venezolanos.** Agosto 2010 – 7mo Congreso Internacional de Dipterología. San José de Costa Rica. (Presentación de Póster)

Population fluctuation of tabanids (Diptera: Tabanidae) in a cattle ranch in the Venezuelan plains

Rangel-Rivas, A.(1) & A. Mijares(2)

E-mail: arangel@ivic.gob.ve

(1) Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela

(2) Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Venezuela

Females of the family Tabanidae are considered important vectors of various pathogenic parasites, due to their haematophagus habits. They are able to generate serious disease as damaging effects due to their bite and creating economic losses in cattle farms. The main objective was to study the population fluctuation of Tabanidae in a farm in Muñoz County, Apure State, Venezuela. Monthly captures were carried out from November 2009 until May 2010, period in which we comprised the seasonal transition of rain-drought and drought-rain respectively. Six Canopy traps were installed (Hribar et al., 1991) distributed at random in an area of 9 km², which is between gallery forests and a savanna occupied by cows, buffaloes and horses. The traps were placed with an approximate distance of 25 m between them. The precipitation data was obtained from a weather station, located on the farm and compared with the data of the weather station of the National Institute for Agricultural Investigations in Mantecal in the Apure State, Venezuela.

After completing seven samples, the results show a total of 1299 captured specimens, belonging to 11 species. We observe that the peak of highest activity was in the month of December (n = 532), during the transition rain-drought, followed by a progressive decrease during the drought period and then a gradual increase of activity in the transition drought-rain. These results allow us to conclude in a partial way that the seasonal transitions have a very important effect over the population fluctuation of these insects. Additionally, we observed that *Tabanus pungens* (n = 522) and *T. claripennis* (n = 491) were the most numerous species (RA = 40.18% and 37.80%, respectively).

Key words: haematophagy, seasonality, seasonal transition, population fluctuation, relative abundance (RA)

Rangel-Rivas Ariadna; Reyes, Francia y Mijares, Alfredo. **Seroprevalencia de tripanosomiasis bovina determinada por ELISA posterior al tratamiento profiláctico con isometamidium.** Noviembre 2011 – VII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias y III Congreso AVECAL. Maracay – Venezuela. (Presentación oral)

SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMIASIS BOVINA MEDIANTE ENSAYOS DE INMUNOABSORBANCIA LIGADO A ENZIMAS (ELISA-AC/T. EVANSI) POSTERIOR AL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON ISOMETAMIDIUM

Rangel-Rivas, Ariadna^a; Reyes, Francia^b y Mijares, Alfredo^a

^aLaboratorio de Fisiología de Parásitos. Centro de Bioquímica y Biofísica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana, Km. 11. 20632. Caracas - Venezuela.

^bLaboratorio de bioquímica e inmunología de hemoparásitos. Universidad Simón Bolívar. Baruta - Venezuela.

Teléfono: +582125041445. Fax: +582125041093.
Correo electrónico: arangel@ivic.gob.ve

La tripanosomosis bovina genera anualmente cuantiosas pérdidas económicas en nuestro sistema productivo. Algunas explotaciones de tipo extensiva han establecido planes anuales de control de estos hemoparásitos, que constan de la aplicación profiláctica de fármacos tripanocidas. Con la finalidad de evaluar la eficacia de una aplicación anual de Clorhidrato de Cloruro de Isometamidium al 2%, fueron muestreados un grupo de 513 novillas de *Bos indicus* Linnaeus, 1758 en un hatu ganadero en el Municipio Muñoz del Estado Apure. Se realizaron cuatro muestreos equidistantes en el período de un año. Una semana antes de la primera toma de muestra se le aplicó a cada uno de los animales una dosis de 1 mg/kg del medicamento. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron analizadas mediante ensayos de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA) empleando como antígeno extracto purificado de *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885), según el método descrito por Perrone (1992). Los ensayos fueron realizados según protocolo estandarizado previamente en el laboratorio. Se obtuvieron los siguientes porcentajes de seroprevalencia: 75,60% (Punto de corte=0,184. n=320), 57,60% (PC=0,400. n=420), 41,60% (PC=0,446. n=452) y 53,40% (PC=0,199. n=502). Observamos entonces una alta seroprevalencia de la enfermedad al momento de aplicar el tratamiento profiláctico, la cual fue disminuyendo en los meses sucesivos para luego aumentar posterior a los 6 meses, por lo que una medida recomendada es su aplicación dos veces al año en lugar de una.

Palabras claves: Tripanosomosis, profilaxis, seroprevalencia, ELISA, ganado de carne.

Rangel-Rivas Ariadna y Mijares, Alfredo. **Diversidad y fluctuación poblacional de Tabánidos (Diptera : Tabanidae) en un hato de los llanos venezolanos**. Julio 2013 – XXIII Congreso Venezolano de Entomología. Maracaibo – Venezuela. (Presentación de Póster)

**Diversidad y fluctuación poblacional de Tabánidos (Diptera : Tabanidae)
en un hato de los llanos venezolanos**
(Diversity and population dynamics of tabanids (Diptera: Tabanidae) in a cattle
ranch in the Venezuelan plains)

Ariadna Rangel-Rivas^{1,2}; Alfredo Mijares¹

¹ Laboratorio de Fisiología de Parásitos. Centro de Bioquímica y Biofísica.
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana,
Km. 11. 20632. Caracas, 1020A, Venezuela. amijares@ivic.gov.ve

² Postgrado de Entomología. Facultad de Agronomía, Universidad Central de
Venezuela, Maracay, Venezuela.

Las hembras de la familia Tabanidae son consideradas vectores importantes de diversos parásitos patógenos debido a sus hábitos hematófagos. Las enfermedades que éstos generan, así como los efectos perjudiciales propios de la picadura, producen cuantiosas pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas. Con el objetivo de conocer la distribución de las diferentes especies de Tabanidae a lo largo del año, lo cual facilitaría el establecimiento de estrategias de control para estos insectos, se estudió la fluctuación de su población en un hato del Municipio Muñoz del Estado Apure, Venezuela, mediante capturas mensuales desde noviembre 2009 hasta noviembre 2010, período que abarcó tres transiciones estacionales: lluvia-sequía noviembre-2009, sequía-lluvia abril-2010 y lluvia-sequía diciembre-2010. Empleando trampas Canopy, fueron capturados un total de 9133 especímenes hembra, pertenecientes a 10 especies de 4 géneros, observándose un primer pico de aumento significativo de la actividad en el mes de diciembre-2009 (n=532), durante la transición lluvia-sequía, seguido de una disminución progresiva durante el período de sequía y de un nuevo incremento gradual de actividad en la transición sequía-lluvia, hasta presentar un segundo pico importante en septiembre-2010 (n=1018), seguido del umbral máximo de captura obtenido en octubre-2010 (n=3755) para, finalmente, observar una breve disminución en noviembre-2010 (n=2758). *Tabanus pungens* (n=7649) resultó ser la especie más abundante durante todo el período de captura (AR= 83,75%). Adicionalmente, fueron colectados 11 especímenes machos, pertenecientes a dos especies del género *Tabanus* sp. Estos resultados nos permiten concluir que las transiciones estacionales tienen un efecto importante sobre la fluctuación poblacional de estos insectos.

Palabras clave: Abundancia relativa (AR), estacionalidad, hematofagia, período de actividad, tábano.

Rangel-Rivas Ariadna y Mijares, Alfredo. **Estandarización de la técnica de PCR para determinación de *Trypanosoma evansi* en tabánidos (Diptera: Tabanidae) alimentados experimentalmente.** Octubre 2013 – XXI Congreso Latinoamericano de Parasitología (FLAP 2013). Guayaquil – Ecuador. (Presentación de Póster)

Estandarización de la técnica de PCR para determinación de *Trypanosoma evansi* en tabánidos (Diptera: Tabanidae) alimentados experimentalmente

Ariadna Rangel-Rivas^{1,2}; Alfredo Mijares¹

¹Laboratorio de Fisiología de Parásitos. Centro de Bioquímica y Biofísica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana, Km. 11. 20632. Caracas, 1020A, Venezuela. amijares@ivic.gov.ve

²Postgrado de Entomología. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

Introducción

Las moscas hematófagas de la familia Tabanidae representan un problema de salud pública, pues actúan como transmisores de un gran número de patógenos que afectan a humanos y animales ^[1], destacando en Venezuela, por su alta prevalencia, los hemoparásitos del género *Trypanosoma*, causantes de la tripanosomiasis animal. A pesar de conocerse su papel como vector de éste y otros patógenos, son pocos los esfuerzos abocados a investigarlo experimentalmente.

En tal sentido, se realizó la estandarización de una PCR para determinar tripanosomas en el tracto digestivo de tabánidos alimentados experimentalmente con sangre de ratas de laboratorio *Sprague Dawley*, a fin de validar la sensibilidad específica de la técnica para emplearla con tabánidos alimentados capturados en campo. Adicionalmente, se evaluaron dos papeles de filtro empleados como métodos de preservación de las muestras de ADN.

Materiales y métodos

Ratas sanas e infectadas con *Trypanosoma evansi* se expusieron a la picadura de tabánidos, previamente colectados en campo. Se extrajo el sistema digestivo de los tábanos alimentados, se trituró y colocó en papel QIAcard FTA[®] y papel de filtro convencional, a fin de evaluar la eficacia de ambos papeles. Se extrajo el ADN ^[1]; se cuantificó por espectrofotometría y se ajustó la concentración.

Por PCR se evaluaron concentraciones de 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, 5 y 2,5 nanogramos totales de ADN. Se utilizaron cebadores que amplifican la secuencia de espaciadores de transcripción interna (ITS) del ADN ribosómico de *T. evansi* ^[2]. Se revelaron los productos amplificados en geles de agarosa.

Resultados y discusión

Las muestras positivas mostraron bandas para todas las concentraciones probadas y para ambos papeles de filtro, sin embargo se obtuvo mejor definición en el papel FTA. El rango donde se observan las bandas más nítidas es entre 200 y 10 ng para papel FTA y entre 200 y 20 para el papel de filtro, sin embargo para éste último no se obtuvieron patrones de amplificación constantes entre las muestras ni dentro de la misma muestra. Ninguno de los controles negativos probados amplificó la secuencia ITS ni patrones de bandas inespecíficos

Conclusión

La estandarización demostró ser altamente específica y sensible para determinar la presencia de *T. evansi* en muestras de sangre colectada de tabánidos alimentados experimentalmente de ratas infectadas.

Se observan resultados más constantes y nítidos empleando papel FTA, por lo que se puede considerar un buen método de conservación de muestras de ADN. Sin embargo, considerando la relación costo/beneficio, se puede establecer el uso del papel de filtro convencional eficazmente para esta prueba de diagnóstico, siempre y cuando se utilicen concentraciones entre 200 y 75 ng.

Referencias

- Bereczky, S.; Martensson A.; Gil J.P.; Färmert, A. (2005). **Short report : Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*.** The American journal of tropical medicine and hygiene, vol. 72, No.3, 249-251
- Foil, L. (1989). **Tabanids as vectors of disease agents.** Parasitology Today, vol. 5, No. 3, 88-96.
- Njiru, Z.K.; Constantine, C.C.; Guya, S.; Crowther, J.; Kiragu, J.M.; Thompson, R.C.A.; Dávila A.M.R. (2005). **The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes.** Parasitology Research. 95:188-192

Rangel-Rivas Ariadna y Mijares, Alfredo. **Identificación molecular de la fuente de alimentación de tabánidos mediante secuencias de citocromo b.** Julio 2015 - XXIV Congreso Venezolano de Entomología "Profesores Francisco Díaz y José Morales". (Presentación de Póster)



XXIV Congreso Venezolano de Entomología "Profesores Francisco Díaz y José Morales".
Barquisimeto, 6 al 10 de Julio de 2015



Identificación molecular de la fuente de alimentación de tabánidos mediante secuencias de citocromo B (Molecular identification of blood-meal sources in horseflies by cytochrome B sequences).

Ariadna Rangel-Rivas^{1,2} y Alfredo Mijares¹

¹Laboratorio de Fisiología de Parásitos. Centro de Bioquímica y Biofísica. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Carretera Panamericana, Km. 11. 20632. Caracas, 1020A, Venezuela. arangel@ivic.gov.ve

²Postgrado de Entomología. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela.

Los tábanos (Diptera: Tabanidae) son vectores de gran relevancia en el sistema productivo pecuario. Se conoce su capacidad de transmitir mecánicamente diversos hemoparásitos como *Trypanosoma* sp y *Anaplasma* sp, entre otros patógenos. También se ha estudiado el efecto directo de su picadura sobre el ganado, la cual genera intranquilidad y estrés que se traduce en una disminución significativa de los tiempos de pastoreo y descanso y, por tanto, menor ganancia de peso diario de los animales. Cabe destacar que a pesar de su importancia económica son pocos los esfuerzos abocados a estudiarlos en nuestro país; por lo que se considera necesario generar conocimientos desde todas las áreas que ayuden, principalmente, a establecer modelos sobre el comportamiento de los mismos. En tal sentido, este trabajo propone establecer las posibles preferencias de alimentación de diversas especies de tabánidos alimentados naturalmente, para ello se determinó mediante PCR, empleando cebadores que codifican para la secuencia de Citocromo B de vertebrados y posterior secuenciación del ADN, la fuente de alimentación de 32 tábanos capturados mediante trampas Canopy en un hato del Municipio Muñoz, Estado Apure. Se observó una considerable preferencia hacia aves de la especie *Ardea herodias* (43,75%), seguida por rumiantes de producción *Bos taurus* (18,75%), reservorios de hemoparásitos *Hydrochoerus hydrochaeris* (18,75%) y *Rattus norvegicus* (6,25%), y en menor cuantía (3,125% c/u) se hallaron *Ardea alba*, *Bubalus bubalis*, *Caiman crocodilus* y *Odocoileus virginianus*. Adicionalmente se constató que *Trypanosoma* sp. estaba presente en una de las muestras de *Hydrochoerus hydrochaeris*. Estos resultados corroboran que especies de tabánidos desempeñan un papel importante en la transmisión de patógenos en nuestros sistemas productivos.

Palabras clave: Hospedero, reservorio, secuenciación, transmisión mecánica, vector.