

**DETECCIÓN PARASITOLÓGICA Y MOLECULAR DE INFECCIONES
NATURALES POR *TRYPANOSOMA EVANSI* Y *TRYPANOSOMA VIVAX* EN
BÚFALOS DE AGUA (*BUBALUS BUBALIS*) Y CHIGÜIRES
(*HYDROCHOERUS HYDROCHAERIS*) EN LOS ESTADOS APURE, COJEDES
Y GUÁRICO, VENEZUELA**

Parasitological and Molecular Detection of Natural Infection by *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Capybaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) in Apure, Cojedes and Guarico States, Venezuela

Herakles A. García.^{*1}, Maria E. García^{*}, Héctor A. Zerpa^{**},
Gabriela Pérez^{***}, Carmen E. Contreras^{****}, Isis V. Pivat^{*****} y
Alexis Mendoza-León^{*****}

Laboratorio de Hemoparasitos, Cátedra de Parasitología-Departamento de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), Apartado 4563, Maracay, 2101A. Estado Aragua-Venezuela. **Cátedra de Fisiología-Departamento de Ciencias Biomédicas, FCV-UCV. *Médico Veterinario en ejercicio libre. **** Programa de Postgrado en Medicina Veterinaria FCV-UCV. *****Cátedra de Bioestadística-Departamento de Producción e Industria Animal FCV-UCV. *****Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela*

Correo-E: herakles@lycos.com

Recibido: 02/04/04 - Aprobado: 03/12/04

RESUMEN

Este estudio evaluó la presencia de *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de tres estados de Venezuela por técnicas parasitológicas y moleculares (frotis teñido: FT; microcentrifugación capilar: TMC; reacción en cadena de la Polimerasa: PCR), estableciéndose el porcentaje de infecciones activas. En 316 muestras sanguíneas de búfalos las tasas de detección para FT, TMC y PCR fueron de 20 (6,33%), 36 (11,39%) y 60 (18,98%),

ABSTRACT

This study sought to establish the percentage of active infections of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in three Venezuelan states using parasitological and molecular assays (stained blood smear: SBS; microhematocrit centrifugation technique: MHCT; polymerase chain reaction: PCR). From 316 buffaloes blood samples, SBS, MHCT and PCR detected as positive 20 (6.33%), 36 (11.39%) and 60 (18.98%) samples, respectively. Based on PCR

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (Corresponding Author).

respectivamente. Por PCR se caracterizó a *T. vivax* como la especie responsable de todas las infecciones, no detectándose presencia de *T. evansi*. En 186 muestras de chigüires FT y TMC identificaron positividad en 36 (19,35%) y 71 (38,17%) de estas, respectivamente, con altas parasitemias; en 27 de estas se observaron tripanosomas del Subgénero *Megatrypanum*. Por PCR se caracterizaron como *T. evansi* 51 muestras de chigüires, seis con resultados TMC-negativo. No se detectó *T. vivax* en chigüires. Un análisis de *t*-student estableció diferencias ($p < 0.05$) entre los valores de hematocrito (Ht) de búfalos positivos y negativos a tripanosomas; mientras que por análisis de varianza se detectó efecto ($p < 0.05$) del grado de parasitemia sobre el Ht. No hubo ningún efecto ($p > 0.05$) al realizar los mismos análisis para las muestras de chigüires.

(Palabras clave: Tripanosomiasis, búfalos de agua, PCR, capybara, diagnóstico, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, Venezuela)

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis es una enfermedad parasitaria producida por protozoarios hemotrópicos del Género *Trypanosoma*. Su amplia difusión en sistemas de producción animal de países tropicales obedece a condiciones agroecológicas que favorecen la co-existencia de parásitos, vectores, reservorios y hospedadores susceptibles. En Venezuela se señalan tres especies con comportamiento patógeno para animales domésticos y silvestres: *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi*, *Trypanosoma (Duttonella) vivax* y *Trypanosoma (Shizotrypanum) cruzi*; se ha descrito al *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* y al *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*, aunque con menor frecuencia y patogenicidad.

results, *T. vivax* was characterized as the only species responsible for all infections, since *T. evansi* was not detected. Out of 186 capybara blood samples, 36 (19.35%) and 71 (38.17%) were identified as positive by SBS and MHCT, respectively, with high parasitemia; trypanosomes of subgenus *Megatrypanum* were observed in 27 of these samples. By PCR, 51 capybara blood samples tested positive for *T. evansi*, six of them being MHCT negative. *T. vivax* was not found in capybaras. A *t*-student analysis showed differences ($p < 0.05$) between hematocrit values (Ht) from trypanosome positive and trypanosome negative buffaloes. Analysis of variance (ANOVA) showed effect of parasitemia level on the value of HT at $p < 0.05$. These statistical analyses did not find any effect on capybara samples.

(Key words: Trypanosomiasis, water buffaloes, PCR, capybara, diagnosis, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, Venezuela)

T. evansi y *T. vivax* limitan considerablemente la producción pecuaria en África, Asia y Sudamérica. Rivera (1996) reporta que en Venezuela la enfermedad clínica en vacunos y otros ungulados es causada por *T. vivax*; mientras que *T. evansi* es responsable de la infección en équidos. En ambos casos pueden manifestarse una gran diversidad de signos, desde formas asintomáticas hasta formas crónicas con marcado deterioro de la condición corporal, pérdida de peso, anemia, incoordinación, alteraciones en el sistema de la coagulación sanguínea, desórdenes reproductivos y muerte (Contreras et al., 2001; García et al., 2001a).

La transmisión de tripanosomas en países de América tropical es mecánica, mediante *Tabanus* spp. y otros dípteros

hematófagos como *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans*. Se han descrito otros mecanismos menos frecuentes y cuyo impacto epidemiológico se desconoce aún (Hoare, 1965; Betancourt, 1978; López *et al.*, 1979). En ganadería extensiva la transmisión está estrechamente asociada a la presencia de hospedadores silvestres, tales como venados, chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*) y cánidos salvajes, quienes actúan como reservorios al mantener mínimos niveles de parasitemia sin padecer la enfermedad clínica.

Numerosas fincas ganaderas en Venezuela asentadas en ecosistemas de sabana inundable han adoptado la explotación racional de algunas especies silvestres, tales como el chigüire y el *Caiman crocodilus* (baba) para obtener ingresos adicionales. Estos animales son explotados para el uso del cuero y por el valor biológico de la proteína de la carne. El chigüire, por ser el roedor viviente de mayor tamaño en el mundo, es empleado como atractivo ecoturístico. Su alta prolificidad ha permitido una forma rentable de explotación basada en estricta veda y posterior "cosecha" mediante caza controlada (González, 1995). Igualmente, explotaciones vacunas asentadas en este tipo de sabanas han cedido espacio para la producción con especies de mayor adaptabilidad y rusticidad, como los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), quienes han mostrado una excelente productividad bajo condiciones "marginales" para otras especies. En la actualidad se estiman en nuestro país unos 120.000 búfalos, principalmente mestizos de las razas Murrah, Jafarabadi y Nili Ravi, mayoritariamente en las Regiones de los Llanos y Nor-Oriental (Carrero, 2000).

Los ecosistemas de sabana conforman gran parte de los sistemas de producción agrícola y representan el hábitat óptimo para la cría de chigüires y búfalos; sin

embargo, también garantizan la existencia de parásitos y sus vectores. En Venezuela y Brasil, países con importantes poblaciones de chigüires, *T. evansi* es una de las especies que afecta la supervivencia del roedor en su hábitat natural, aunque generalmente las parasitemias son sensiblemente bajas, haciendo del chigüire un importante reservorio del protozoario (Nunes *et al.*, 1987; Arias *et al.*, 1997).

En diversas áreas de producción pecuaria de nuestro país se han detectado infecciones por *T. vivax*, *T. evansi* y *T. theileri* en vacunos y équidos (Rivera, 1996); sin embargo, son escasos los registros bibliográficos de la presencia de tripanosomas en búfalos de agua o en animales silvestres, desconociéndose el papel de los mismos en el ciclo de la enfermedad. Toro *et al.* (1978) registraron infecciones activas por tripanosomas en búfalos, pero no efectuaron la identificación específica del agente causal. García *et al.* (2001b) realizaron un hallazgo similar empleando métodos parasitológicos y sugirieron la posible participación de *T. vivax* como el agente infectivo, con base a inoculaciones de animales experimentales.

Sin embargo, las limitaciones de sensibilidad y especificidad inherentes a los métodos diagnósticos empleados en estudios de tripanosomiasis animal, representan verdaderos obstáculos para evaluar la presencia de parásitos y lograr su identificación específica. Los métodos parasitológicos arrojan una alta proporción de resultados falsos negativos cuando la parasitemia es baja; mientras que la falta de especificidad y la persistencia de anticuerpos dificultan el análisis de los resultados serológicos (McManus y Bowles, 1996). Ambas situaciones han sido solventadas con el desarrollo de técnicas que se fundamentan en la detección de marcadores moleculares ubicados en el genoma de parásitos, ya que las mismas han muestra-

do ser altamente específicas al permitir identificar agentes patógenos en el nivel taxonómico de especies, con una sensibilidad de detección extraordinaria. En este sentido, la amplificación de secuencias específicas de ADN a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha mostrado gran potencial para el diagnóstico de tripanosomiasis animal causada por *T. evansi*, *T. vivax* y *T. theileri* (Wuyts et al., 1995; Masake et al., 1997; Rodrigues et al., 2003).

El propósito de este trabajo fue evaluar a través de técnicas parasitológicas, la presencia de infecciones activas por tripanosomas en chigüires y búfalos, efectuando la identificación específica de las especies encontradas a través de PCR. Estos aspectos aportarán valiosa información para valorar el papel desempeñado por estos hospedadores en la epizootiología de la tripanosomiasis animal en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Áreas de Muestreo

La población de estudio comprendió aproximadamente el 10% de los búfalos asentados en cuatro fincas de tres importantes estados ganaderos del país: Guárico (Hato ubicado en el Municipio Camaguán, Latitud Norte 8° 00' 751"-Longitud Oeste 67° 31' 494"), Apure (Hato ubicado en Latitud Norte 7° 35' 15"-Longitud Oeste 65° 20' 56") y Cojedes (Hatos ubicados en los Municipios Rómulo Gallegos-Las Vegas: Latitud Norte 9° 22' 53"- Longitud Oeste 68° 34' 10" y Ricaurte-Parroquia la Libertad: Latitud Norte 9° 6' 45"-Longitud Oeste 68° 25' 20"); áreas en las que la tripanosomiasis vacuna y equina es muy prevalente (Rivera 1996; García 2001b). Las características agroecológicas de estos Hatos son coincidentes; dos períodos claramente definidos, uno de lluvia (noviembre-abril) y

uno seco (mayo-octubre); temperatura promedio de 28 grados y precipitación anual promedio de 1100-1200 mm. La mayor diferencia se presenta en el Hato del estado Guárico, por encontrarse en el área de influencia de los Esteros de Camaguán, los períodos de lluvia y sequía coinciden, pero la pluviometría promedio anual es de 1500 mm y la zona es una sabana inundable. Se muestrearon aleatoriamente un total de 316 búfalos de diferente sexo y edad. Estos Hatos están dedicados exclusivamente a la explotación del búfalo; aunque con un importante plantel de équidos de trabajo, así como mucha diversidad de fauna silvestre.

De igual modo, se muestrearon 186 chigüires adultos, principalmente machos, en un Hato del estado Apure (Latitud Norte 7° 50'-Longitud Oeste 67° 30'), durante el período de caza controlada en marzo de 2003. Este Hato se dedica a la producción de carne vacuna, existiendo predominantemente animales cebú (*Bos indicus*), équidos de trabajo y abundante fauna silvestre; sus características agroecológicas son similares a las antes descritas. La cría de chigüires se efectúa como actividad complementaria y el número de animales que se beneficia cada año depende del resultado del censo anual efectuado por los organismos gubernamentales correspondientes, representando generalmente un 5% de la población estimada.

De cada animal fue colectada una muestra sanguínea con anticoagulante (EDTA) que se almacenó a 4°C protegida de la luz solar, empleando un tubo Vacutainer® y aguja estéril por animal. Los búfalos se muestrearon por punción de la vena yugular y los chigüires por cardiocentesis. Las muestras fueron evaluadas por métodos parasitológicos directos y sometidas a extracción de ADN, dentro de un lapso que nunca excedió seis horas post-recolección.

Procedimientos para el Diagnóstico de Tripanosomiasis

Técnica de microcentrifugación capilar (TMC)

Las muestras fueron evaluadas según lo establecido por Woo (1969). Brevemente, capilares Tecnon® de 80 µL se llenaron en 2/3 de su capacidad, sellaron y centrifugaron a 12.000 g/5 min. Posteriormente se evaluaron al microscopio en busca de tripanosomas en movimiento en el área de interfase entre el plasma y el taco celular conformado por células rojas y glóbulos blancos, comúnmente denominado "buffy-coat". Se estimó el nivel de parasitemia de las muestras positivas evaluando el contenido del buffy-coat en cámara de Neubauer. El grado de parasitemia se valoró en una escala del 0 al 5, según se describe a continuación: (0) ningún tripanosoma; (1) 1-10 tripanosomas; (2) 11-20 tripanosomas; (3) 21-50 tripanosomas; (4) 51-100 tripanosomas; (5) mas de 100 tripanosomas. Luego de la microcentrifugación se determinó el valor del volumen porcentual de glóbulos rojos mediante lectura en una tabla Hawksley micro-haematocrit reader (Hawksley & Sons, Lancing, UK).

Preparación de frotis teñidos

En la elaboración de los frotis se empleó la tinción de Giemsa al 10% sobre extendidos preparados con 5 µL de sangre y fijados con metanol, evaluando al microscopio con objetivo de inmersión (100X).

Extracción de ADN y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las muestras sanguíneas se procesaron según lo descrito por Desquesnes y Tresse (1996), a fin de obtener el material a emplear como patrón para la PCR. Se realizó una centrifugación inicial (430

g/10 min.) y se procedió a coleccionar 1000 µl de plasma que se transfirieron a tubos eppendorf estériles. Se centrifugó a 12.000 g/5 min. y el taco celular se sometió a extracción de ADN mediante DNAzol, siguiendo el protocolo de la casa comercial (Gibco BRL®). Una alícuota de 1 µL se utilizó para la PCR.

Se emplearon dos pares de cebadores para la amplificación de ADN de *T. evansi* y *T. vivax*, los cuales fueron descritos por Wuyts *et al.* (1995) y Masake *et al.* (1997). Los cebadores designados como 21-mer (5'-TGC AGA CGA CCT GAC GCT ACT-3') y 22-mer (5'-CTC CTA GAA GCT TCG GTG TCC T-3') fueron descritos con especificidad para el Subgénero *Trypanozoon*, donde generan una banda de amplificación de 227 pares de bases (pb); mientras que los cebadores ILO1264 (5'-CAG CTC GGC GAA GGC CAC-3') e ILO1265 (5'-TCG CTA CCA CAG TCG CAA TC-3') se reportan con especificidad para *T. vivax*, generando un producto de amplificación de 400 pb. La sensibilidad de detección de ADN purificado del ensayo, para ambas especies de protozoarios fue de 10 picogramos (pg), con condiciones de reacción y especificidad previamente optimizadas (García, 2000).

Las PCR se ejecutaron en un termociclador PTC-200 MJ Research®, en tubos eppendorf estériles, en un volumen total de 25 µL. Cada tubo recibió 24 µl de una mezcla de reacción consistente de 22 µL de PCR Super-Mix (Gibco BRL®: 22 µL mM Tris HCL pH 8.4; 55mM KCl; 1.65 mM MgCl₂; 0.22 mM dGTP; 0.22 mM dATP; 0.22 mM dTTP; 0.22 mM dCTP; 22 U de *Taq DNA polimerasa* recombinante/ml) más 1µL de cada cebador en concentración de 0.23 pmol/µL. Las muestras problemas, procesadas como se indicó, fueron agre-

gadas en un volumen de 1 μ L, procediendo a cubrir con 25 μ l de aceite mineral (Sigma®). Para la amplificación por PCR se efectuó una fase inicial de desnaturalización a 95°C/5 min., seguida de 40 ciclos de reacción a 94°C/60 seg. de desnaturalización, 55 °C/90 seg. como fase de anillamiento y 72 °C/60 seg. como fase de polimerización; la cual en el último ciclo se extendió hasta 3 minutos.

Finalizados los 40 ciclos, 10 μ l del producto de PCR se mezclaron con buffer de carga (Glicerol 50%, 1mM EDTA, 0.4% azul de bromofenol, 0.4% Xilencianol), efectuándose una electroforesis en geles de agarosa (Ultra pure, Gibco BRL®) al 1.5 % en TBE 1 X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) durante 75 min. a 75 V. Se empleó el marcador de peso molecular 100 pb-Ladder (Gibco BRL®). Los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de ethidium (0.5 μ g/ml) durante 15 min. y se verificaron los productos de PCR en un transiluminador de luz ultra-violeta (Stratagene®), obteniéndose registros fotográficos de los mismos. Los controles positivos consistieron en 10 nanogramos (ng) de ADN purificado de los aislados de referencia de *T. evansi* (TE0) y *T. vivax* (ILO2160), donados por la Dra. Hilda Pérez (IVIC-Venezuela) y el Dr. Alberto Dávila (FIOCRUZ-Brasil), respectivamente. La cuantificación del ADN se efectuó en un espectrofotómetro (Beckman®. Mod. DU-7500). Los controles negativos fueron cócteles de reacción sin ADN. Se verificó la positividad o negatividad de las muestras procesadas por PCR al evidenciar o no las bandas de amplificación correspondientes con los controles empleados. La amplificación positiva para *T. vivax* se estableció por la presencia de una banda de ADN de 400 pb; mientras que para *T. evansi* el pro-

ducto amplificado esperado como marcador de positividad fue de 227 pb.

Análisis estadístico

Los valores de hematocrito (Ht) de búfalos y chigüires positivos y negativos a tripanosomas fueron evaluados estadísticamente a través de una prueba de *t*-student mediante el programa Statistix-1996, con la finalidad de determinar el posible efecto de la presencia de tripanosomas. El grado de parasitemia sobre el comportamiento de la variable Ht se evaluó a través de un análisis de varianza (ANOVA), un diseño completamente aleatorizado y sus respectivas pruebas de medias (Tukey). Igualmente, se efectuó un análisis descriptivo reportando la media y el error estándar de los valores Ht para muestras sanguíneas de ambas especies animales.

RESULTADOS

Detección de tripanosomas por métodos parasitológicos

La evaluación microscópica de los frotis teñidos permitió detectar protozoarios extracelulares morfológicamente semejantes a tripanosomas en 36 (19,35%) y 20 (6,33%) de las muestras sanguíneas de chigüires y búfalos, respectivamente. Fue predominante una notable variabilidad morfológica que impidió la identificación específica de los mismos. Se observaron tripanosomas con vacuolas intracelulares, sin kinetoplasto, extremidad posterior de formas muy diversas y tamaños variables (Figura 1); en general se observó una morfología muy variada no coincidente con la forma típica de las especies más comunes del país: *T. evansi* y *T. vivax*. Algunos frotis de sangre de chigüires mostraron protozoarios morfológicamente semejantes *T. evansi*; mientras que en otros provenientes de búfalos se evidenciaron

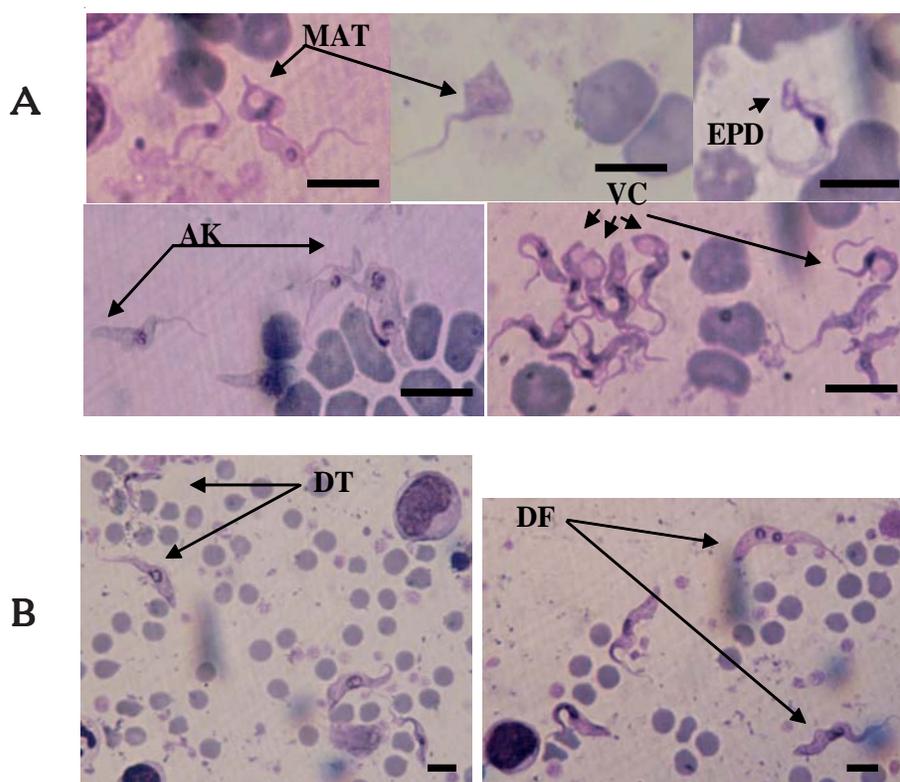


Figura 1. Microfotografías de frotis sanguíneos de chigüires (A) y búfalo (B) con infecciones naturales por *Trypanosoma* sp. Nótese la considerable variabilidad morfológica detectada en ambos casos. Tinción Giemsa 10%; Barra 10 μ m. Composición (A): MAT: morfología atípica; VC: vacuolas intra-citoplasmáticas; EPD: extremidad posterior dilatada; AK: ausencia de kinetoplasto. (B): DT diferentes tamaños; DF: diferentes formas

formas coincidentes tanto a *T. evansi* como a *T. vivax*.

La evaluación por medio de la TMC reveló un mayor grado de infecciones activas al obtenido a través de frotis, con tasas de 38,17% (71/186) para las muestras de chigüires y 11,39% (36/316) para las provenientes de búfalos; en estas últimas se evidenciaron parasitemias que oscilaron entre los grados 1 y 3, según la escala previamente establecida. Ni la evaluación de los frotis ni la TMC permitieron una identificación específica de los tripanosomas detectados.

Una proporción considerable de las muestras de chigüires con resultados positivos por TMC (24/71 = 33,80%) presen-

tó parasitemias muy altas (grados 4 y 5); mientras que en 29,58% (21/71) las infecciones oscilaron entre los grados 2 y 3. En el resto de las muestras positivas esta técnica permitió evidenciar una especie parasitaria semejante a las del Género *Trypanosoma*, pero con un tamaño muy superior al presentado en las muestras anteriores; la observación de los frotis reveló un extremo posterior agudizado y un flagelo largo libre hacia el extremo anterior, lo que aunado al tamaño evidenciado permitió sugerir su clasificación en el Subgénero *Megatrypanum* (Figura 2). Las parasitemias de estas muestras fueron considerablemente bajas, oscilando entre 1 y 4 tripanosomas en la evaluación en

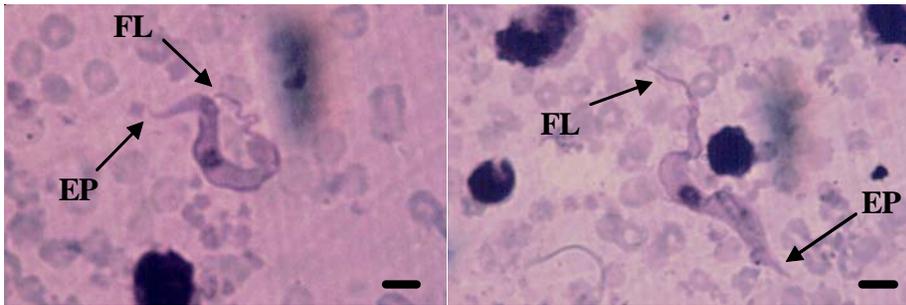


Figura 2. Microfotografías de frotis sanguíneos de chigüires mostrando tripanosomas con un tamaño superior al reportado para las especies más comunes de nuestro país *T. evansi* y *T. vivax*. Fueron agrupadas en el Subgénero *Megatrypanum*. Nótese la extremidad posterior (EP) agudizada y un flagelo libre (FL) en una longitud importante. Tinción Giemsa 10%; Barra 10 μ m

cámara de Neubauer (grado 1). Se identificó una infección mixta (1,41%) constituida por estos parásitos y tripanosomas que posteriormente fueron caracterizados por PCR como *T. evansi*. Otro hallazgo importante fue la presencia de microfilarias en 54/186 muestras sanguíneas de chigüires (29,03%). De este total, 19,89% fueron infecciones simples; mientras que 6,45% y 2,69% correspondieron a infecciones mixtas con *T. evansi* (caracterizado por PCR) y *Megatrypanum*, respectivamente.

Detección de tripanosomas por PCR

La PCR (cebadores 21-mer/22-mer) resultó positiva para 51 muestras de chigüires, 45 de estas positivas por TMC. La presencia de una banda de ADN de ~ 227 pb, acorde con el control positivo, sugirió infección por especies del Subgénero *Trypanozoon*. La Figura 3 muestra los resultados de siete de estas muestras. Se observa la presencia de la amplificación esperada (carriles 1, 2, 4 y 6), considerándose positivas al comparar con el control positivo (carril 8). En esta misma figura se observaron bandas de menor tamaño, las cuales se consideraron artefactos de reacción (múltiples de cebadores); no obstante, estas no interfi-

reron con la interpretación de los resultados, los cuales fueron concluyentes al comparar con los controles. Ninguna de las muestras de chigüires resultó positiva con los cebadores ILO1264/ILO1265, sugiriendo la ausencia de *T. vivax*. Se debe resaltar que las 27 muestras TMC positivas para los tripanosomas considerados del Subgénero *Megatrypanum*, resultaron negativas por PCR, para ambos grupos de cebadores.

En el análisis de las muestras de búfalos la PCR empleando ILO1264/ILO1265 permitió la detección de *T. vivax* en 60 de ellas (18,98%), un valor tres veces superior a la tasa de detección por frotis y casi dos veces superior a la detección por TMC. En todas estas muestras se observó la presencia de una banda de ADN acorde al tamaño esperado (400 pb). La Figura 4 muestra los resultados del procesamiento de seis muestras bufalinas con los cebadores antes citados; se observó la presencia del producto esperado como señal de positividad en los carriles 1, 3, 4, 5 y 6, al comparar con el control positivo del ensayo (carril 7). El uso de los cebadores 21-mer/22-mer sobre las muestras de búfalos no generó ningún producto de amplificación, sugiriendo la ausen-

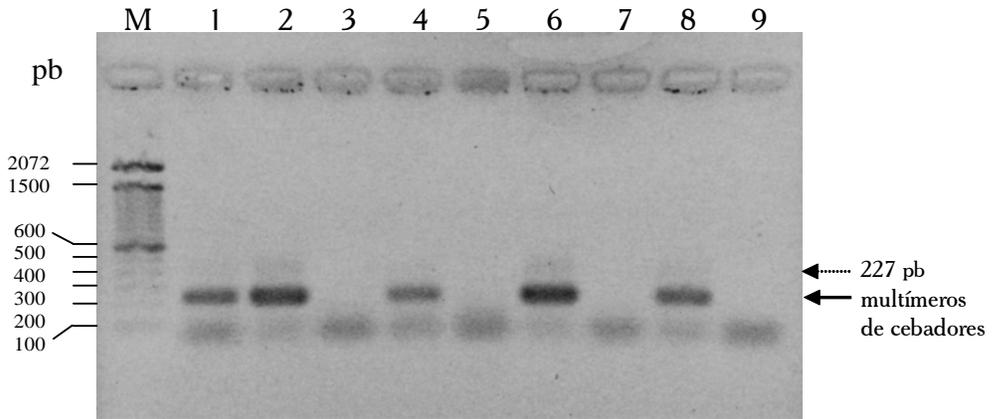


Figura 3. Productos de PCR a partir de siete muestras sanguíneas de chigüires (carriles 1 al 7) con infecciones naturales por *T. evansi*, procesadas según se describe en «Materiales y Métodos». Se emplearon los cebadores 21-mer/22-mer a 0.23 pmol/ μ l. M: Marcador de peso molecular 100 pb-ladder Gibco BRL®; Carril 8: control positivo, 10 ng de ADN purificado de *T. evansi* TE0. Carril 9: control negativo, sin ADN. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiado bajo iluminación U.V. La flecha punteada señala el producto de amplificación esperado para muestras positivas (227 pb). La flecha completa señala multímeros de primers considerados artefactos de reacción

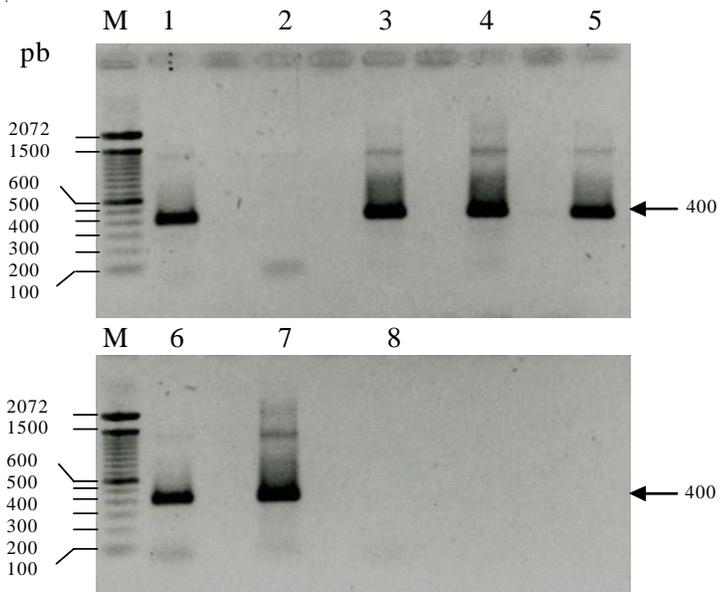


Figura 4. Productos de PCR a partir de seis muestras sanguíneas de búfalos de agua (carriles 1 al 6) con infecciones naturales por *T. vivax*, procesadas según se describe en «Materiales y Métodos». Se emplearon los cebadores ILO1264/ILO1265 a 0.23 pmol/ μ l. M: Marcador de peso molecular 100 pb-ladder (Gibco BRL®); Carril 7: control positivo, 10 ng de ADN de *T. vivax* ILO2160. Carril 8: control negativo, sin ADN. La flecha señala el producto de amplificación esperado para muestras positivas (400 pb)

cia de infecciones por especies del Subgénero *Trypanozoon* en estos animales.

La prueba de *t*-student para los valores de Ht en relación al diagnóstico de las muestras de búfalos resultó significativo ($p < 0.05$). El Ht promedio de los animales no infectados fue 33,996% +/- 0,2773 y el de los animales infectados de 30,467% +/- 0,6459. Del mismo modo, el ANOVA permitió establecer la existencia de efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) al relacionar el grado de parasitemia con el valor Ht. Los valores de Ht promedios para los grados de infección 0, 1, 2 y 3 fueron 33,786% +/- 0,2725; 29,550% +/- 1,1527; 30,182% +/- 1,3539 y 29,600% +/- 1,9131, respectivamente. Un análisis de comparación de medias para estos cuatro grados de parasitemia encontrados permitió establecer dos grupos en los cuales las medias no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$), específicamente los grados 2 y 3; así como dos grupos cuyas medias difirieron estadísticamente ($p < 0.05$), siendo estas los grados 0 y 1.

En la evaluación de las muestras provenientes de chigüires la prueba de *t* no detectó diferencias estadísticas ($p > 0.05$) del valor Ht de las muestras de animales infectados por tripanosomas (36,519% +/- 0,6638) y aquellas de animales no infectados (35,507% +/- 0,8518).

DISCUSIÓN

El presente estudio corrobora la amplia diseminación de *T. evansi* en chigüires, hecho que ha sido documentado en nuestro país y otras regiones de Sudamérica (Arias *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 1994) y se reafirma la presencia y amplia distribución de *T. vivax* en búfalos de agua, previamente demostrada por García (2000)

a través de PCR. La especificidad de ésta última técnica permitió caracterizar como *T. vivax* todos los tripanosomas detectados en las muestras de búfalos, sugiriendo una alta susceptibilidad a la infección, comportamiento que no es coincidente al de la tripanosomiasis bufalina en países de Asia y África, donde *T. evansi* es la especie de mayor diseminación, impacto económico y patogenicidad (Verloo *et al.* 2000). Es necesario ampliar la evaluación hacia otros estados del país, con la finalidad de ratificar este hallazgo o bien detectar posibles infecciones por *T. evansi*, *T. theileri* u otras especies de tripanosomas, hecho que en Sudamérica es factible desde un punto de vista epidemiológico debido a la presencia de vectores hematófagos comunes entre estas especies (Rivera 1996).

La alta sensibilidad de los métodos diagnósticos basados en amplificación y detección de ácidos nucleicos ha sido reportada tanto en la evaluación de muestras de hospedadores vertebrados (Holland *et al.*, 2001) como de insectos vectores (Ouma *et al.*, 2000), lo que representa una ventaja al permitir un mejor estimado del grado de infección. En esta investigación los resultados de la evaluación de muestras de búfalos mostraron tasas de detección por PCR hasta tres veces superiores a las de frotis y TMC, aumentando significativamente la probabilidad de detectar parásitos en animales con infecciones crónicas y en aquellos con infecciones recién adquirida, en los que los niveles de parasitemia se encuentran muy por debajo del límite de detección de los métodos parasitológicos. Del mismo modo, la PCR para el diagnóstico de *T. evansi* en chigüires permitió detectar 6 muestras adicionales a las de TMC, resultados que lejos de no demostrar una sensibilidad superior para la PCR, fueron un reflejo de los altos nive-

les de parasitemia encontrados en estas muestras.

En muchas ocasiones existe la necesidad del uso conjunto de métodos parasitológicos estándares y métodos moleculares, aprovechando las bondades de cada uno. En la evaluación efectuada en los chigüires, la TMC permitió detectar 27 muestras positivas, cuyos resultados por PCR fueron negativos tanto a *T. evansi* como a *T. vivax*. La evaluación parasitológica permitió sugerir su ubicación en el Subgénero *Megatrypanum*; no obstante, es necesario optimizar una PCR para la detección específica de estos organismos y clarificar esta situación. La alta proporción de muestras positivas a estos parásitos, así como su presencia en infecciones mixtas con *T. evansi* y microfilarias, demanda la realización de nuevos estudios para su caracterización específica. Los chigüires y otros animales silvestres pueden actuar como reservorios de especies del Subgénero *Megatrypanum* (*T. theileri*, *T. shawi*), *T. evansi*, *T. cruzi*, entre otros tripanosomatideos (Nunes *et al.*, 1987; Dereure *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003).

La amplia diseminación de *T. vivax* en búfalos y de *T. evansi*, microfilarias y *Megatrypanum* en chigüires, plantea de igual modo la necesidad de evaluar la participación de estos hospedadores en la epizootiología de la tripanosomiasis animal. De hecho, muestras sanguíneas recolectadas en equinos de trabajo y vacunos en el mismo Hato donde se efectuó el muestreo de chigüires, resultaron positivas por PCR a *T. evansi* y *T. vivax*, encontrándose también algunas muestras positivas por TMC a posibles *Megatrypanum* (datos no mostrados). Surge la interrogante sobre el papel que como posibles reservorios desempeñan estos hospedadores vertebrados. Morales *et al.* (1976) efectuaron diagnóstico de *T. evansi* en chigüires mediante frotis sanguíneos, así

como inoculaciones experimentales en ratas albinas, chigüires y animales domésticos, evaluando el comportamiento de la parasitemia y la patogenicidad de los aislados. Los hallazgos les permitieron demostrar infectividad para todos los animales inoculados y sugerir un posible estado de portador asintomático en chigüires, a diferencia de equinos y caninos, donde la cepa de *T. evansi* mostró alta patogenicidad. Los autores plantean que los chigüires pudieran ser reservorios para las infecciones de animales domésticos. La asociación entre la presencia de *T. evansi* en chigüires y epidemias de tripanosomiasis equina ha sido documentada (Rangel, 1905).

Arias *et al.* (1997) detectaron una alta prevalencia serológica de tripanosomiasis en chigüires, sugiriendo un estado de reservorio debido a la ausencia de signos clínicos. No obstante, los altos niveles de parasitemia demostrados en muchos chigüires de esta investigación, así como la evidencia clínica de enfermedad en muchos de estos animales (datos no mostrados), son más coincidentes con un estado de hospedador susceptible, al menos durante condiciones particulares determinantes de estrés. Investigaciones sobre efectos patógenos de *T. evansi* en distintos hospedadores han mostrado considerables alteraciones morfo-funcionales que pudiesen comprometer la salud productiva y la vida de animales infectados (Finol *et al.*, 2001; Zerpa, 2004). Cabe destacar que no se observó diferencia significativa ($p > 0.05$) en los valores de Ht entre chigüires infectados y no infectados, surgiendo la necesidad de efectuar estudios con inoculaciones experimentales en los que se incluya la evaluación de otras variables (hemoglobina, conteo de glóbulos rojos) que permitan dilucidar la posible existencia de un mayor grado de resistencia al desarrollo de un cuadro anémico, típico de la infección por tripanosomas. Es

posible que las altas parasitemias aquí encontradas hayan sido debidas a condiciones de estrés, tales como escasez de pastos y de fuentes de agua, predominantes durante el período de sequía en el que se efectuó el muestreo. Estas condiciones generan una mayor agregación de animales, competencia por el alimento, reducción en la capacidad de respuesta inmune y facilitan la transmisión, como fue planteado por Ojasti, (1973).

La amplia diseminación de *T. vivax* en búfalos encontrada, obliga a evaluar su posible papel como hospedador susceptible y como reservorio del protozoo, toda vez que a pesar de la mayor rusticidad que se le atribuye, muchos animales manifiestan la enfermedad clínica, incluyendo reducción del valor hematocrito, como la reportada por García *et al.* (2001b) y ratificada a través de los análisis estadísticos aquí efectuados, donde se demostró efecto ($p < 0.05$) tanto de la presencia como del grado de infección sobre el Ht. Estos resultados coinciden con los de Waiswa y Katunguka (2004), quienes demostraron una reducción altamente significativa del Ht de vacunos infectados por *T. vivax*. En muchas fincas donde se explotan simultáneamente vacunos y búfalos, empleando équidos como animales de trabajo, los búfalos pudiesen actuar como el principal reservorio de *T. vivax* para la infección en vacunos y pequeños rumiantes. Igualmente, a pesar de que en esta investigación no se detectaron infecciones por *T. evansi* en búfalos, esta especie es descrita en otros países como altamente susceptible al protozoo.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación ponen en evidencia la presencia de diferentes especies de tripanosomas compartiendo un mismo nicho ecológico e inclu-

so, compartiendo un mismo hospedero, situación de gran interés desde el punto de vista epidemiológico y de control de la enfermedad, debido a la diferente susceptibilidad de estos parásitos a los principios farmacológicos disponibles, así como por la particularidad de algunos mecanismos de transmisión, tales como la participación de quirópteros hematófagos y la vía oral, sugeridas para *T. evansi* (Hoare, 1965, Franke *et al.*, 1994), así como la transmisión transplacentaria y por ixódidos, reportada para *T. vivax* (Betancourt, 1978; López *et al.*, 1979). Se demuestra la utilidad de pruebas como la PCR para la caracterización específica y para obtener mejores estimados del grado de infección existente en un momento determinado.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo recibió soporte financiero de los Proyectos de Investigación: FONACIT S1-2001000988 y CDCH-UCV: PI: 11-10-4832-2001. Los autores agradecen a las siguientes unidades de producción por el apoyo brindado: Hatos Santa Luisa y Don Emilio, Estado Apure. Finca Terecay, Estado Guárico. Hatos La Soledad y El Charquito, Estado Cojedes.

REFERENCIAS

- Arias, J.; García, F.; Rivera, M. and López, R. 1997. *Trypanosoma evansi* in Capibara from Venezuela. *J. Wildl. Dis.*, **33**: 359-361.
- Betancourt, A. 1978. Transmisión prenatal del *Trypanosoma vivax* de bovinos en Colombia. *Rev. ICA*, **13**: 127-129.
- Carrero, J. 2000. Búfalo Asiático: Un recurso inexplorado para producir proteína animal. DIANCO, Táchira-Venezuela.
- Contreras, I.; Soto, H.; Gavidia, J.; Silva, L. y Bello, A. 2001. Efecto de la infec-

- ción experimental de *Trypanosoma vivax* sobre el peso, condición corporal y algunas características reproductivas en carneros mestizos de la raza tropical West African. *Rev. Fac. Cs. Vets-UCV*, **42**: 125-133.
- Dereure, J.; Barnabé, C. ; Madélenat, F. ; Vié, J.-C. and Raccurt, C. 2001. Trypanosomatidae from wild mammals in the neotropical rainforest of French Guiana. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, **95**: 157-166.
- Desquesnes, M. and Tresse, L. 1996. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. *Rev. Étl. Méd. Vét. Pays Trop*, **49**: 322-327.
- Finol, H.; Boada-Sucre, A.; Rossi, M. and Tejero, F. 2001. Skeletal muscle ultrastructural pathology in mice infected with *Trypanosoma evansi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol*, **33**:65-71.
- Franke, C.; Greiner, M. and Mehlitz, D. 1994. Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Poconé (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop*, **58**: 159-169.
- García, F.; Suárez, C. y Baldizán, G. 2001a. Revisión de las alteraciones de la coagulación sanguínea en la tripanosomiasis animal, con especial referencia al *Trypanosoma vivax*. *Rev. Fac. Cs. Vets-UCV*, **42**: 109-124.
- García, P. Herakles. 2000. Evaluación comparativa de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el diagnóstico microscópico y Serológico de *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi* en infecciones animales. Tesis de Maestría, Postgrado en Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela, p. 146.
- García, H.; Aguirre, A.; Pérez, G. y Mendoza-León, A. 2001b. Diagnóstico parasitológico y serológico de infecciones por *Trypanosoma* spp. en dos rebaños bufalinos (*Bubalus bubalis*) del Estado Guárico. *Rev. Fac. Cs. Vets-UCV*, **42**: 15-26.
- González, E. 1995. El Capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Estado actual de su producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO, Roma. Producción y Sanidad Animal. P. 122.
- Hoare, C. 1965. Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes. *Acta Trop*, **22**: 204-216.
- Holland, W.; Claes, F.; My, L.; Thanh, N.; Tam, P.; Verloo, D.; Büscher, P.; Goddeeris, B. and Vercruyssen, J. 2001. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet. Parasitol*, **97**: 23-33.
- López, G.; Thompson, K. and Bazalar, H. 1979. Transmisión experimental de *Trypanosoma vivax* por la garrapata *Boophilus microplus*. *Rev. ICA*, **14**: 93-96.
- Masake, R.; Majiwa, P.; Molloo, S.; Makau, J.; Njuguna, J.; Maina, M.; Kabata, J.; Ole-MoiYoi, O. and Nantulya, V. 1997. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polimerasa chain reaction. *Exp. Parasitol*, **83**: 193-205.
- McManus, D. and Bowles, J. 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: Their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int. J. Parasitol*, **26**: 687-704.
- Morales, G.; Wells, E. and Angel, D. 1976. The capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as a reservoir host for *Trypanosoma evansi*. *J. Wildl. Dis*, **12**: 572-574.

- Nunes, V.; Oshiro, E.; Freitas, E.; Takeda, G. and Rodrigues, M. 1987. *Trypanosoma (Megatrypanum) shawi* n. Sp., um parasita de capivara, *Hydrochaeris hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) (Rodentia: Hydrochoeridae). *Semina*, **8**: 21-23.
- Ojasti, J. 1973. Estudio biológico del Chigüire o capibara. *Gac. Méd. Caracas*, **12**:105-113.
- Ouma, J.; Masake, R.; Masiga, D.; Moloo, S.; Njuguna, J. and Ndung'u, J. 2000. Comparative sensitivity of dot-ELISA, PCR and dissection method for the detection of trypanosome infections in tsetse flies (*Diptera: Glossinidae*). *Acta Tropica*, **75**: 315-321.
- Rangel, R. 1905. Nota preliminar sobre la peste boba y la derrengadera de los equideos de los Llanos de Venezuela. *Gac. Med. Car*, **12**: 105-113.
- Rivera, M. A. 1996. Trypanosomiasis. En: Hemoparasitosis Bovinas. Anauco Ed, Caracas-Venezuela. pp 13-84.
- Rodrigues, A.; Campaner, M.; Takata, C.; Dell'Porto, A.; Milder, R., Takeda, G. and Teixeira, M. 2003. Brazilian isolates of *Trypanosoma (Megatrypanum) Theileri*: diagnosis and differentiation of isolates from cattle and water buffalo based on biological characteristics and randomly amplified DNA sequences. *Vet. Parasitol*, **116**: 185-207.
- Toro, M.; León, E.; López, B.; García, J. y Ruiz, A. 1978. Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV)-Corporación Venezolana de Guayana (CVG). Informe técnico sobre hemoprotozoarios en búfalos, équidos y bovinos en Isla de Güara-Edo. Monagas. p 35.
- Verloo, D.; Holland, W.; My, L.; Thanh, N.; Tam, P.; Goddeeris, B.; Vercruyse, J. and Büscher, P. 2000. Comparison of serological test for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from North Vietnam. *Vet. Parasitol*, **92**: 87-96.
- Woo, P.T. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool*, **47**: 921-923.
- Wuyts, N.; Chokesajjawatee, N.; Sarataphan, N. and Panyin, S. 1995. PCR amplification of crude blood on microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in dairy cattle. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop*, **75**: 229-237.
- Waiswa, C. and Katunguka-Rwakishaya, E. 2004. Bovine trypanosomiasis in southwestern Uganda: packed-cell volumes and prevalences of infection in cattle. *Ann. Trop Med. Parasitol*, **98**: 21-27.
- Zerpa, G. Héctor. 2004. Efecto de la infección aguda por *Trypanosoma evansi* sobre la reactividad vascular de la aorta de rata. Trabajo de Ascenso-Profesor Asistente, Facultad de Ciencias Veterinaria, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Aragua, Venezuela. p. 69.