

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Trypanosoma vivax* EN OVINOS NATURALMENTE INFECTADOS EN DOS HATOS DE LOS MUNICIPIOS SAN FERNANDO Y BIRUACA, ESTADO APURE, VENEZUELA.

**Molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in naturally-infected sheep from two farms at San Fernando and Biruaca Counties, Apure State, Venezuela.**

**Herakles García<sup>1\*</sup>, Ariadna Rangel-Rivas<sup>1</sup>, Ignacio Contreras<sup>2</sup>, María-E. García<sup>1</sup>, Francisco García<sup>1</sup> y Trina Perrone<sup>†</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio de Hemoparásitos., Cátedra de Parasitología, Departamento de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563/2101A, Maracay, Venezuela. <sup>2</sup>Cátedra de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela, Apartado 4563/2101A, Maracay, Venezuela. <sup>†</sup>Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Apartado 21827/1020A, Caracas, Venezuela. \* Correspondencia: Tel-Fax: + 58 243 2466325. E-mail: heraklesantonio@gmail.com

## RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo efectuar una caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos de dos hatos en los cuales estos rumiantes, conjuntamente con vacunos y búfalos de agua, comparten la misma área agroecológica, estableciendo el potencial papel de los ovinos como fuente de infección de tripanosomosis por *T. vivax* para los grandes rumiantes. La técnica de microcentrifugación capilar (TMC) fue usada para establecer el porcentaje de infecciones activas por tripanosomas existente en los animales evaluados. Se empleó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar la identificación de especie, mientras que un ensayo de PCR-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) permitió evaluar la variabilidad intraespecífica entre los aislados de *T. vivax* detectados en ovinos vs. aquellos provenientes de bóvidos (vacunos y búfalos de agua), colectados en la misma área de producción. De las 320 muestras de sangre de ovinos colectadas, la TMC detectó positividad en 11 (4,35%), lo que es de gran relevancia epidemiológica debido a la baja sensibilidad de esta metodología. Los resultados de PCR permitieron caracterizar a *T. vivax* como la especie presente en todas las infecciones activas detectadas. Todos los animales infectados mostraron un valor de hematocrito inferior ( $P < 0,05$ ) al registrado en animales no infectados (22,435 vs. 31,450). El ensayo de PCR-RFLP permitió observar la

existencia de perfiles de restricción similares entre los aislados de *T. vivax* evaluados, sugiriéndose la ausencia de variación intraespecífica para el marcador molecular en estudio, independientemente del origen de hospedador del que provino la muestra (ovinos, vacunos, búfalos de agua). Estos resultados permiten sugerir que los aislados de *T. vivax* que infectan ovinos, vacunos y búfalos de agua en el área de estudio pudiesen estar estrechamente relacionados desde un punto de vista genético y, consecuentemente, los ovinos pudiesen desempeñar un importante papel en la epidemiología de la tripanosomosis bovina en esta área de estudio, recomendándose que éstos sean incorporados en los programas terapéuticos y preventivos contra tripanosomosis.

**Palabras clave:** Ovinos, tripanosomosis, caracterización molecular, reservorios, *Trypanosoma vivax*.

## ABSTRACT

This study was made to achieve a molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in two Venezuelan farms where both small ruminants (mainly ovines) and bovines (cattle and water buffaloes) share the same agroecological area. In addition, it was made to assess the role of sheep as source of *T. vivax* infection for cattle and buffalo herds. The microhematocrit centrifugation technique (MHC) was used to establish the percentage of current trypanosome infection. A PCR-based assay was used to confirm the species identification while a PCR-RFLP assay was used for studying intra-specific variation among *T.*

*vivax* from sheep vs. those from other livestock from the same area. From 320 sheep blood samples, MHC detected 11 (4,35%) which is of remarkable epidemiological significance due to the low sensitivity of this method. Based on PCR results, *T. vivax* was characterized as the only species responsible for all sheep infections. All infected animals showed a lower packed cell volume value ( $P < 0,05$ ) when compared with the non-infected (22,435 vs. 31,450). The PCR-RFLP technique revealed similar profiles among *T. vivax* isolates suggesting a non intra-specific variation within the molecular marker amplified regardless the host (sheep water buffaloes or cattle). Thus, it was suggested that *T. vivax* infecting sheep, cattle, and buffaloes in the study area could be genetically closely related. These findings show that sheep may play an important role in the epidemiology of livestock trypanosomiasis in this area and they might be incorporated into therapeutic and preventive programs against livestock trypanosomiasis.

**Key words:** Sheep, trypanosomiasis, molecular characterization, reservoir, *Trypanosoma vivax*.

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma (Duttonella) vivax* y *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* son dos especies de hemoparásitos de gran interés en Venezuela debido al impacto negativo que ejercen sobre la producción pecuaria [12]. Estos parásitos causan una enfermedad crónica donde los animales afectados exhiben anemia severa, pérdida de peso, alteraciones reproductivas, anorexia y muerte, con parasitemias bajas, difíciles de detectar por métodos parasitológicos convencionales [12].

Muchas explotaciones ganaderas del país están asentadas en áreas donde la tripanosomosis por *T. vivax* y *T. evansi* tiene un comportamiento enzoótico, con un importante grado de infecciones activas, a pesar del empleo de medidas quimioprolácticas [5]. Así mismo, algunas de estas explotaciones ganaderas, principalmente vacunos (*Bos* spp.) y búfalos de agua (*Bubalus bubalis*), mantienen rebaños de pequeños rumiantes que contribuyen de modo significativo en la producción de proteína cárnica y láctea para consumo interno y como fuente de ingresos adicionales. No obstante, los programas de medicina preventiva para estas especies frecuentemente se limitan a vacunaciones de carácter obligatorio contra los virus rábico y de fiebre aftosa.

Estudios sobre tripanosomosis en ovinos (*Ovis* spp.) y/o caprinos (*Capra* spp.) de Venezuela son bastante escasos. Aspectos epidemiológicos de relevancia, tales como prevalencia, formas de transmisión y especies involucradas son aún poco comprendidos. Infecciones experimentales en ovinos empleando aislados venezolanos de *T. vivax*, han mostrado que el estado de salud de estos animales es afectado severamente [15,19], sin embargo, es limitada la información bibliográfica sobre la situación bajo condiciones naturales de producción. Igualmente, se desconoce si bovinos y ovinos comparten la

misma especie de tripanosoma. Recientes estudios en Kenya han mostrado que pequeños rumiantes (ovinos y caprinos) se infectan de modo natural y son afectados por *T. vivax* y otras especies de tripanosomas, transmitidos principalmente por *Glossina* spp. [11]. En Venezuela, este díptero no está presente, no obstante, se piensa que diversas especies de tripanosomas puedan ser transmitidas por dípteros hematófagos como *Tabanus* spp., *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans* [12], situación que ha sido demostrada en países africanos, donde la transmisión de tripanosomas entre vacunos se mantiene en áreas libres de la mosca tse-tse (*Glossina* spp.) [3].

El diagnóstico parasitológico de infecciones activas por tripanosomas es basado en la detección microscópica de parásitos en la sangre mediante técnicas como la microcentrifugación capilar (TMC) y la evaluación de la capa de plasma que se encuentra sobre la de glóbulos blancos, posterior al proceso de centrifugación ("buffy-coat") [6]. Estos métodos son ampliamente utilizados bajo condiciones de campo, a pesar de su baja sensibilidad de detección. La identificación precisa de *T. vivax* ha sido efectuada mediante métodos como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando marcadores moleculares especie-específicos localizados en el genoma de estos parásitos hemotrópicos [6]. La asociación de la PCR con ensayos de digestión enzimática y la posterior evaluación del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción generados (PCR-RFLP), ha mostrado gran utilidad para el estudio de variación intraespecífica y reconocimiento de cepas de tripanosomas [8,17] y otros tripanosomatídeos [2].

El objetivo de esta investigación fue caracterizar aislados ovinos de *T. vivax*, mediante el empleo de PCR y un ensayo asociado de restricción enzimática (PCR-RFLP), a fin de evaluar el papel de los ovinos como fuente de infección de *T. vivax* en explotaciones pecuarias de Venezuela donde bovinos (vacunos y búfalos de agua) y ovinos comparten la misma área agroecológica. Se emplearon métodos parasitológicos convencionales para la detección de infecciones activas, y un ensayo de PCR para la identificación específica de los tripanosomas detectados. Así mismo, mediante PCR-RFLP se efectuó el estudio de variabilidad intra específica entre aislados de *T. vivax* de ovinos, vacunos y búfalos de agua, colectados en la misma área de estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio, animales y métodos

Se colectaron muestras de sangre de 320 ovinos mestizos West African (1 - 6 años de edad) de ambos sexos. Las muestras fueron tomadas por punción de la vena yugular entre febrero 2005 y junio 2006 y evaluadas para la presencia de tripanosomas por TMC. Los ovinos provinieron de dos explotaciones pecuarias cuya principal actividad económica es la producción de vacunos y/o búfalos de agua. Los ovinos experimentales estaban sometidos a un sistema de pastoreo exten-

sivo, con alimentación *ad libitum*, basada en pastos naturales de las explotaciones, durante el día y retornando en la tarde (5:30-6:00 PM) a corrales con cercas ornamentales de alambre, sin protección contra insectos. Estos animales eran mantenidos en las explotaciones para la producción de carne, leche y queso para consumo interno de los trabajadores. Es importante notar que dichas unidades de producción poseen igualmente una gran variedad de fauna silvestre, incluyendo venados (*Odocoileus virginianus*), chigüires (*Hydrochoeris hydrochaeris*), osos hormigueros (*Myrmecophaga tridactyla*), y algunos reptiles, entre otros. El área de estudio estuvo localizada en los municipios San Fernando y Biruaca, del estado Apure, Venezuela (latitud 7° 50' Norte – longitud 67° 30' Oeste), donde la tripanosomosis animal posee carácter enzoótico [12]. Esta región es caracterizada por una temperatura media anual de 28°C y una pluviometría promedio de 1400 mm. Existen dos periodos claramente definidos: una estación seca (enero-junio) y una estación lluviosa (julio-diciembre). El periodo lluvioso se caracteriza por una alta infestación por tabanidos y otros dípteros hematófagos. Las unidades de producción fueron seleccionadas sobre la base de investigaciones previas en tripanosomosis en equinos (*Equus caballus*)/chigüires y vacunos, atribuidas a infecciones por *T. evansi* y *T. vivax*, respectivamente [5,6]; y debido a la presencia constante de infección tripanosómica, a pesar de medidas del control quimioprofiláctico.

El número de ovinos muestreado fue determinado para cada rebaño siguiendo el criterio sugerido por Thrusfield [16]. Este criterio considera el tamaño de cada rebaño y, debido a la ausencia de información bibliográfica sobre tripanosomosis en ovinos de Venezuela (infecciones naturales), se asumió una prevalencia de 5% (prevalencia promedio de tripanosomosis bovina en el área de estudio, reportada por Toro [18]) con un nivel de confianza de 95%. Las muestras sanguíneas fueron colectadas en ovinos (320) seleccionados de modo aleatorio. Cada muestra se obtuvo empleando un sistema Venoject™ (Terumo Medical, Somerset, NJ, EUA) en tubos estériles conteniendo EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) como anticoagulante. Las muestras fueron mantenidas refrigeradas desde su colección (8-10°C) y protegidas de la luz directa del sol. En un lapso inferior a las 6 horas de su colección, cada muestra sanguínea fue evaluada para la presencia de tripanosomas mediante TMC, según la metodología descrita por Woo [20]. Así mismo, para cada muestra fue estimado el valor de hematocrito, como el volumen porcentual de células rojas en la sangre, para lo cual se empleó un lector de microhematocrito (Hawksley y Sons, Lancing, Reino Unido). Se efectuó un conteo de tripanosomas a partir de la evaluación microscópica de cada tubo microcapilar, empleando el hemocitómetro de Neubauer; la parasitemia se registró de la siguiente manera: 0 (ningún tripanosoma observado); 1 (1 – 10 tripanosomas observados); 2 (11 – 50 tripanosomas observados); ó 3 (> 50). Una alícuota (300 µL) de cada muestra positiva a tripanosoma fue usada para extracción de ADN genómico para PCR.

## Ensayos de PCR

Con el objeto de identificar molecularmente la(s) especie(s) de tripanosoma detectada(s) parasitológicamente, se empleó un ensayo de PCR para cada muestra positiva. El aislamiento del ADN genómico se efectuó mediante el estuche comercial Wizard™ DNA purification system (Promega, Madison, WI, EUA), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos iniciadores usados fue descrita previamente en la literatura [10, 21]. Los oligonucleótidos 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 una especificidad en el nivel taxonómico de subgénero [21]. Estos generan un producto de amplificación de 227 pares de bases (pb). El otro par de oligonucleótidos previamente descritos por Masake y col. [10], fue sometido a algunas modificaciones, siendo la secuencia definitiva empleada en este ensayo: ILO1264 (5' – CAG CTC GGC GAA GGC CAC – 3') y ILO1265 (5' – TCG CTA CCA CAG TCG CAA TC – 3'). Estos oligos generan un producto de amplificación de 400 pb y poseen alta especificidad para *T. vivax*.

Las PCR fueron ejecutadas en un termociclador MJ Research PTC-200 (Watertown, MA, EUA), en un volumen total de reacción de 50 µL, conteniendo: 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada deoxi-ribonucleótido trifosfato (dNTP), 0,45 pmol/µL de cada oligonucleótido, 1 U Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen Brasil, São Paulo, Brasil) y 2 µL de ADN como blanco para la reacción. El termociclador fue programado para generar las siguientes condiciones de reacción: una pre-incubación por un período de 10 min a 95°C, seguida de 30 ciclos de amplificación, cada uno de los cuales con 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C, con un período final de polimerización de 72°C por 5 min. Se emplearon controles positivos contentivos de ADN genómico de *T. vivax* y *T. evansi*, previamente caracterizados por PCR [6]. Los controles negativos incluidos en cada PCR (sin ADN y con ADN de ovinos, búfalos o vacunos) no generaron producto de amplificación. Una alícuota (10 µL) de cada producto de PCR fue evaluada por electroforesis (Thermo EC.FB 135-90-115) en geles de agarosa 1,5% (Invitrogen, UltraPure™ Agarose), teñido con SYBER Safe™ DNA gel stain (Molecular Probes, Eugene Oregon, EUA). Muestras de ADN de *Trypanosoma vivax* provenientes de búfalos de agua (10 muestras) y vacunos (5 muestras), colectadas en investigaciones previas en las mismas unidades de producción [5,6], fueron también amplificadas por PCR para comparar con aquellas provenientes de ovinos, mediante ensayos de PCR-RFLP.

## Ensayos de PCR-RFLP

Los productos de PCR empleando como patrón ADN de *T. vivax* proveniente de ovinos parasitológicamente positivos, así como de vacunos y búfalos de agua, fueron purificados mediante el estuche comercial Wizard™ PCR Preps DNA purification system (Promega, Madison, WI, EUA). Una alícuota

(10 µL) de dichos productos fue digerida con 1 µL (10 U) de cada una de las siguientes endonucleasas de restricción. (*Hae* III, *Rsa*I, *Hpa* II, *Hsp92* II, *Pst* I, *Nde* II, *Bgl*II; Promega, Madison, WI, EUA), en un volumen final de reacción de 20 µL, durante 3,5 h. Las digestiones de los productos de PCR fueron efectuadas de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial para cada una de las enzimas usadas. Las endonucleasas de restricción fueron seleccionadas sobre la base de la secuencia nucleotídica del producto esperado [10] con los oligonucleótidos empleados en la PCR. Un volumen de 15 µL de cada digestión fue mezclado con buffer de carga y separado por electroforesis horizontal (agarosa 2,5%) en solución tampón TBE 0,5X a 75 V. Para la determinación del tamaño de las bandas de restricción generadas se empleó como marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Invitrogen Technologies, Brazil). Cada gel fue teñido del modo antes descrito y fotografiado bajo luz ultra violeta. Los fragmentos de restricción generados (PCR-RFLP de *T. vivax* aislado de ovinos, búfalos y vacunos) fueron comparados, a fin de determinar la presencia o ausencia de sitios de restricción específicos.

### Análisis de los Resultados

La prevalencia de infecciones activas por tripanosomas en los ovinos muestreados fue calculada como el número de muestras positivas por TMC dividido por el total de muestras evaluadas en el momento de muestreo. Con la finalidad de evaluar el posible efecto de la tripanosomosis sobre el valor del volumen porcentual de glóbulos rojos en la sangre de cada ovino muestreado (hematocrito: Ht), el Ht de cada ovino infectado fue comparado estadísticamente con el de los ovinos no infectados, mediante una prueba de "t de Student". El ensayo de PCR fue usado para definir si los tripanosomas detectados en los animales positivos pertenecían a la especie *T. vivax* o a algún miembro del subgénero *Trypanozoon* (*T. evansi*, debido a la ausencia de otros miembros del subgénero en Venezuela). Los patrones de PCR-RFLP se emplearon para comparar y evaluar la variabilidad intra específica de los aislados de *T. vivax* detectados en ovinos con aquellos provenientes de vacunos y búfalos de agua, sobre la base del marcador molecular amplificado con el par de oligonucleótidos empleado.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### Infecciones Activas por Tripanosomas y valores de Hematocrito

La técnica de microcentrifugación capilar reveló que 4,35% (11/320) de los ovinos evaluados presentó infección activa por *Trypanosoma* spp. para el momento del muestreo. Todas las muestras positivas presentaron un alto grado de parasitemia (registrado como grado 3: 11 – 50 tripanosomas observados, según la escala establecida), donde los animales infectados tuvieron un valor de hematocrito inferior ( $P < 0,05$ ) al de aquellos no infectados (22,435 vs. 31,450). Estos resultados

fueron similares a los reportados por otros investigadores [4], quienes registraron un valor de prevalencia de 5,1%. Otros estudios [11] encontraron pequeños rumiantes infectados por tripanosomas, aunque los métodos parasitológicos empleados (TMC y "buffy-coat") mostraron un bajo nivel de sensibilidad. Un reporte previamente realizado [9] otorgó especial importancia al posible papel desempeñado por pequeños rumiantes en la epidemiología de la tripanosomosis al encontrar una prevalencia promedio de 27,62% empleando métodos estándares de detección de tripanosomas y técnicas de concentración. En el presente estudio, una prevalencia de infecciones activas de 4,35% puede ser considerada de remarcada importancia epidemiológica debido a la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas usadas, así como por el comportamiento ondulante de la parasitemia por *T. vivax* [12].

Otro hallazgo de interés en este estudio fue el alto grado de parasitemia encontrado en los ovinos naturalmente infectados. Estas altas parasitemias discordan con reportes previos [9,14] que muestran un número muy bajo de parásitos en infecciones naturales de ovinos. Esta situación puede ser atribuida a un comportamiento diferente de las cepas de *T. vivax* actuantes en ovinos de Venezuela, al comparar con las actuantes en países africanos, donde fueron hechos los estudios antes señalados. Definir si los hallazgos aquí descritos corresponden al comportamiento natural de *T. vivax* en ovinos en el país, requiere estudios que involucren un mayor número de muestras, en diferentes períodos de tiempo y con la incorporación de animales provenientes de diversas áreas geográficas. No obstante, estos resultados representan un importante aporte al mostrar el comportamiento natural de infecciones activas por *T. vivax* en la especie ovina, bajo condiciones naturales de explotación en Venezuela. Altos niveles de parasitemia pueden facilitar la transmisión mecánica por tabanideos y otros dípteros hematófagos. Es importante notar que los ovinos aquí evaluados estuvieron sometidos a un sistema de alimentación, basado exclusivamente en pastoreo extensivo, en un área enzoótica a tripanosomosis animal (*T. vivax* y *T. evansi*), así como sometidos a un alto reto de infestación por dípteros hematófagos, principalmente *Tabanus* spp. y *Haematobia* spp. Debido a que estos dípteros fueron abundantemente observados (alta densidad de población) durante el proceso de muestreo, se sugiere que ellos pudiesen estar involucrados en la transmisión mecánica de *T. vivax* en el área de estudio, como fue sugerido previamente en Venezuela [12] y en algunas áreas de África, en las que la mosca tse-tse (*Glossina* spp.) está ausente o en baja densidad poblacional [14]. Esta alta población de hematófagos puede estar relacionada a factores agroecológicos, principalmente la presencia de áreas cubiertas de vegetación y amplias áreas anegadizas, las cuales favorecen el ciclo de vida de estos dípteros [14]. Se requieren estudios adicionales para clarificar en el nivel taxonómico de especies cuáles son los hematófagos actuantes en la transmisión de *T. vivax* en Venezuela.

Los ovinos identificados como positivos por métodos parasitológicos mostraron bajos valores de hematocrito al

compararlos con los valores encontrados en los animales no infectados (22,435 vs. 31,450). Una situación similar fue reportada en tripanosomosis en pequeños rumiantes [4]; mientras que otras investigaciones [14] correlacionaron positivamente el valor de hematocrito con la condición corporal y negativamente con la presencia de infección tripanosómica en vacunos. Estos autores [14] también reportaron una correlación negativa entre condición corporal y la infección por *T. vivax*. En consecuencia, los ovinos infectados pudiesen exhibir una autoresistencia al movimiento debido a la anemia y mala condición corporal, lo que posiblemente facilitaría la acción hematófaga de algunos vectores y la transmisión de tripanosomas entre ovinos del mismo rebaño y hacia otros rumiantes que estuviesen en las cercanías. Ovinos infectados experimentalmente con aislados venezolanos de *T. vivax* han mostrado anemia severa, disturbios reproductivos y ocasionalmente muertes [1,19]. Así mismo, caprinos experimentalmente infectados por *T. evansi* han mostrado reducciones significativas en los valores de hematocrito, hemoglobina y conteo total de hematíes [13]. Situaciones similares pudiesen estar ocurriendo bajo condiciones naturales de infección en Venezuela. Los valores de hematocrito establecidos soportan este planteamiento; no obstante, debido a que los ovinos aquí evaluados estuvieron bajo condiciones naturales de pastoreo y sin un programa sanitario adecuadamente establecido, diversos agentes infecciosos y no infecciosos pudiesen haber influenciado dicho índice, principalmente helmintos gastrointestinales. Es importante resaltar que los ovinos en el área de estudio no están incluidos en los programas preventivos contra tripanosomosis bovina, en consecuencia, los animales infectados pudiesen estar desempeñando un importante papel como fuente de tripanosomas para los vectores.

#### Identificación y Caracterización de Tripanosomas por PCR y Ensayos de PCR-RFLP

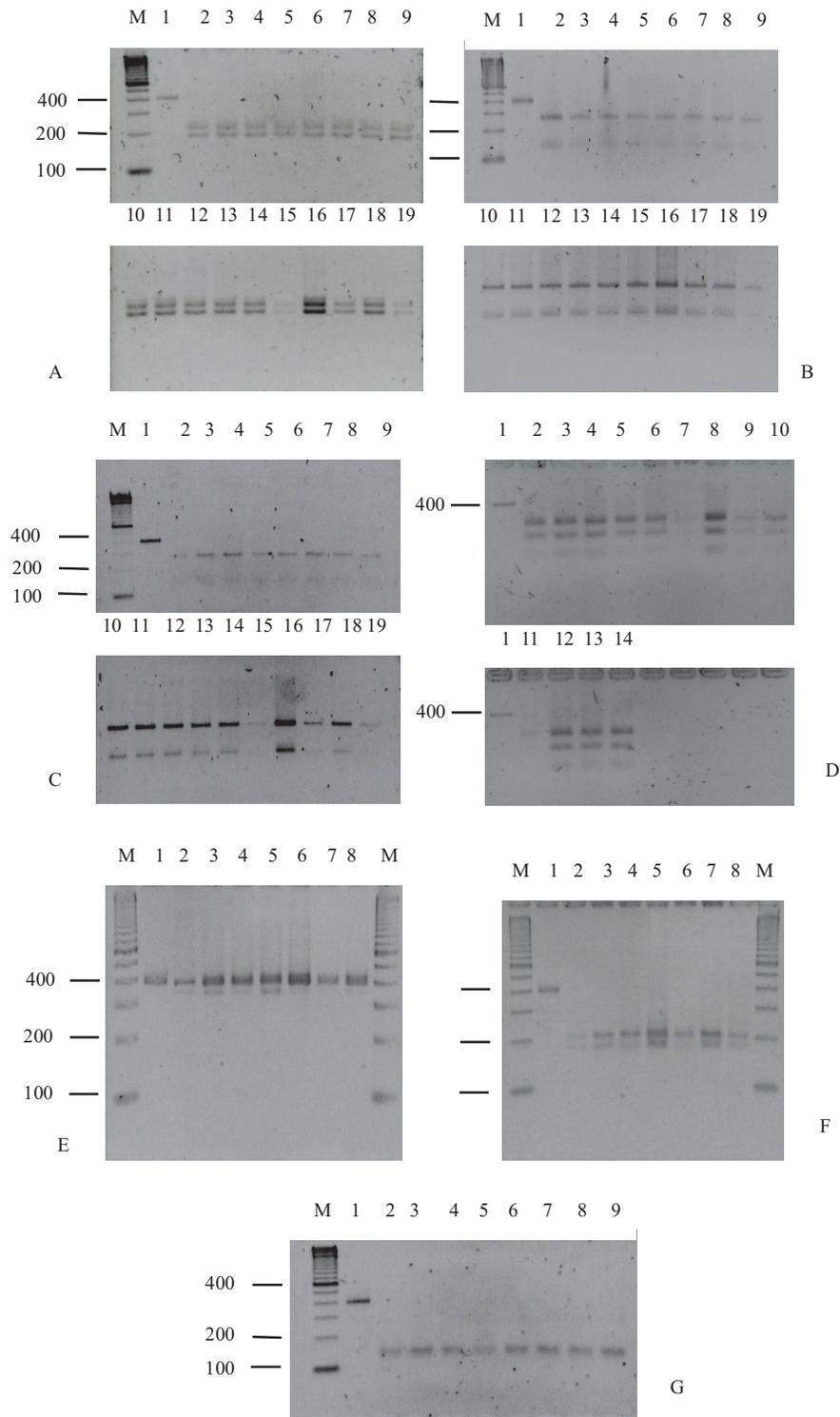
Todas las muestras positivas a tripanosomas fueron caracterizadas por PCR como infectadas por *T. vivax*. No se detectó ninguno de los miembros del subgénero *Trypanozoon*. Es importante resaltar que exclusivamente, las muestras que resultaron parasitológicamente positivas se evaluaron por PCR, a fin de efectuar la identificación específica de la especie actuante.

El uso de los oligonucleótidos iniciadores ILO1264/ILO1265 generó el fragmento esperado (400 pb) cuando el ADN patrón provino de los ovinos parasitológicamente positivos, así como cuando éste provino de tripanosomas aislados de búfalos de agua (10) y vacunos (5) naturalmente infectados. Estos tripanosomas de grandes rumiantes fueron previamente caracterizados como *T. vivax* a través de PCR [5,6]. Todos los productos de PCR generados de las 26 muestras positivas a tripanosomas (diferente origen de hospedador) fueron considerados específicos para *T. vivax* debido a la alta temperatura de anillamiento (60°C) y la especificidad de secuencia de los oligonucleótidos usados como iniciadores de reacción. Los resulta-

dos obtenidos concordaron con un reporte previo [9], donde *T. vivax* fue la especie predominante en pequeños rumiantes, representando 49,3% de los tripanosomas detectados. Sin embargo, este reporte también señaló la presencia de *T. congolense* y *T. brucei* (15,3 y 7,3%, respectivamente), así como infecciones mixtas. Otras investigaciones [4] encontraron *T. vivax* en 25,9% de las muestras infectadas por tripanosomas, siendo *T. congolense* la especie más comúnmente detectada (40,7%); infecciones mixtas (*T. congolense* - *T. vivax* y *T. vivax* - *T. brucei*) también fueron reportadas por estos autores. En el presente estudio, todas las especies de tripanosomas detectadas fueron tipificadas como *T. vivax*. No obstante, la evaluación de un mayor número de muestras pudiese revelar la presencia de infecciones por *T. evansi*, particularmente por la abundancia de equinos y chiguirees frecuentemente infectados por ésta última especie [7], así como por la amplia diversidad de fauna silvestre, potenciales reservorio de *T. evansi*.

El análisis de RFLP de los amplicones obtenidos por PCR, mediante el uso de las endonucleasas *Pst* I, *Nde* II, *Bgl* III, *Hpa* II, *Rsa* I, *Hae* III y *Hsp*92 II, no reveló ningún perfil que sugiriese la existencia de variación intra específica, independientemente del hospedador del cual provino el aislado de *T. vivax* (ovejas, búfalos, vacunos) (FIG. 1). A pesar de que para cada una de las enzimas empleadas se generó un patrón de restricción distintivo, el número de bandas observado para cada enzima fue idéntico para todas las muestras de ADN de ovinos naturalmente infectados y estos perfiles fueron idénticos a aquellos obtenidos a partir de ADN de *T. vivax* de búfalos y vacunos naturalmente infectados, colectados en la misma área de estudio. Los perfiles de restricción empleando las endonucleasas *Pst* I, *Nde* II y *Bgl* III (cada una de ellas con un sitio de restricción, sobre la base de la secuencia nucleotídica publicada [10]), mostraron las dos bandas esperadas, cada una de las cuales de aproximadamente 213/186 pb, 133/266 pb y 133/266 pb, respectivamente (FIG. 1A-C). El empleo de la endonucleasa *Rsa* I (también con un sitio de restricción) sólo permitió evidenciar una banda de aproximadamente 349 pb; la banda de menor tamaño esperada (50 pb) no fue observada en el gel (FIG. 1E). La endonucleasa *Hpa* II (con tres sitios de restricción: FIG. 1D) mostró el patrón de bandas esperado, sin embargo, no fue posible distinguir entre las dos bandas de menor tamaño esperadas (48 y 49 pb) debido a la migración conjunta de éstas. El perfil de restricción usando la enzima *Hae* III (dos sitios de restricción; FIG. 1F) mostró las dos bandas esperadas (207 y 178 pb); sin embargo, tal como se esperaba para geles de agarosa convencional, la banda de 14 pb no fue observada. El perfil de bandas empleando *Hsp*92 II (dos sitios de restricción; FIG. 1G), mostró solamente una banda, posiblemente debido al similar tamaño de los tres fragmentos esperados (143/135/121), difícil de resolver con geles de agarosa convencional. Es importante notar que los patrones de bandas descritos fueron consistentes en diferentes experimentos efectuados.

La similitud en los perfiles de restricción entre los diversos aislados de *T. vivax* permite sugerir una alta similitud



**FIGURA 1. PERFILES DE PCR-RFLP MEDIANTE EL EMPLEO DE LAS ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN (A-G): *Pst* I, *Nde* II, *Bgl*II, *Hpa* II, *Rsa*I, *Hae* III, *Hsp92* II. LÍNEA "M": MARCADOR DE PESO MOLECULAR 100-pb DNA-LADDER. LÍNEA 1 (A-G): MARCADOR MOLECULAR ESPECÍFICO DE *T. vivax* AMPLIFICADO POR PCR (400 pb; NO DIGERIDO), COMO REFERENCIA. LÍNEA 2-8, 9-14 Y 15-19 (A-C); 2-7, 8-10 Y 11-14 (D); 2-4, 5-6 Y 7-8 (E-F); 2-4, 5-6 Y 7-9 (G): FRAGMENTOS DIGERIDOS PROVENIENTES DE *T. vivax* AISLADOS DE OVINOS, BÚFALOS Y VACUNOS, RESPECTIVAMENTE/ PCR-RFLP PATTERNS USING RESTRICTION ENDONUCLEASES (A-G): *Pst* I, *Nde* II, *Bgl*II, *Hpa* II, *Rsa*I, *Hae* III, *Hsp92* II. LANE "M": 100-bp DNA LADDER AS MOLECULAR MARKER. LINE 1 (A-G): *T. VIVAX*-SPECIFIC MOLECULAR MARKER PCR AMPLIFIED (400 bp; NO RESTRICTED) AS REFERENCE. LANE 2-8, 9-14 AND 15-19 (A-C); 2-7, 8-10 AND 11-14 (D); 2-4, 5-6 AND 7-8 (E-F); 2-4, 5-6 AND 7-9 (G): RESTRICTED FRAGMENTS COMING FROM *T. VIVAX* ISOLATES FROM SHEEP, BUFFALOES AND CATTLES, CORRESPONDINGLY.**

entre éstos, independientemente del origen de hospedador (ovino, búfalos, vacunos), al menos para el marcador molecular empleado. Es de gran interés evaluar ADN de aislados de *T. vivax* provenientes de diferentes áreas geográficas, así como el análisis de secuencias y el uso de metodologías más sensibles en la detección de variabilidad intra específica. Del mismo modo, evaluar otros marcadores moleculares, tales como los genes que codifican para las subunidades ribosómicas 18S, 24S y los espaciadores internos transcritos (ITS), marcadores que debido a su función biológica poseen secuencias de interés filogenético.

Considerando la aparente susceptibilidad de los ovinos a *T. vivax* observada en este estudio, el alto grado de parasitemia detectado, la similitud en los perfiles de restricción demostrada por PCR-RFLP y el hecho que en el país es común la práctica de mantener rebaños de pequeños rumiantes (sin un adecuado programa sanitario) en explotaciones cuya actividad principal es la cría de vacunos y búfalos de agua, se resalta la importancia y utilidad de incluir pequeños rumiantes en los programas quimioprolácticos y quimioterapéuticos para *T. vivax* como una vía de reducir la prevalencia general de infecciones activas por este protozoario.

La habilidad para identificar *T. vivax* en ovinos de una importante área ganadera de Venezuela, así como de correlacionar estos aislados con otros de vacunos y búfalos de agua de la misma área de estudio, representa una información epidemiológica muy útil concerniente al papel de estos pequeños rumiantes como portadores de infecciones por *T. vivax* y el factor de riesgo potencial que pudiese significar el mantener estos animales pastoreando junto con otros animales susceptibles a la infección por *T. vivax* sin un programa preventivo bien estructurado. En Venezuela, *Tabanus* spp. y otros dípteros hematófagos han sido asociados con infección tripanosómica; sin embargo, el papel de éstos en la transmisión aún es incierto. Al mismo tiempo, el papel de otros animales domésticos y silvestres en la epidemiología de *T. vivax* requiere ser clarificado a fin de lograr una mejor comprensión de la tripanosomosis por este protozoario y establecer adecuadas medidas de control.

## CONCLUSIONES

El papel de los ovinos como potenciales fuentes de infección de *T. vivax* en el área de estudio parece ser de significativa importancia. En este estudio se detectó un porcentaje de infecciones activas de 4,35%, mediante métodos parasitológicos de baja sensibilidad. Estos pequeños rumiantes pudiesen portar no solo *T. vivax*, sino también otras especies de tripanosomas. Este estudio indica que *T. vivax* pudiese ser una importante causa de reducción de la productividad en pequeños rumiantes, así como que estos ovinos pueden actuar como fuente de infección para vacunos y búfalos. Investigaciones adicionales pudiesen proveer más información al respecto.

Resultados de PCR/PCR-RFLP soportan que *T. vivax* es la principal especie de tripanosoma en los ovinos del área de estudio y que esta especie pudiese estar genéticamente relacionada con los aislados encontrados en vacunos y búfalos de agua. Estos datos muestran que los ovinos desempeñan un papel importante en la epidemiología de la tripanosomosis debida a *T. vivax* y consecuentemente deberían ser incorporados en los programas terapéuticos y preventivos contra tripanosomosis bovina.

## AGRADECIMIENTO

Esta investigación recibió apoyo financiero del *Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación* del *Ministerio de Ciencia y Tecnología* de Venezuela a través del Proyecto BID-FONACIT 2006000128.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CONTRERAS, I.; SOTO, H.; GAVIDIA, J.; SILVA, L.; BELLLO, A. Efecto de la infección experimental de *Trypanosoma vivax* sobre el peso, condición corporal y algunas características reproductivas en carneros mestizos de la raza tropical West African. **Rev. de la Fac. de Cs. Vet-UCV.** 42: 125-133. 2001.
- [2] DE ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; DOS SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Vet. Parasitol.** 140: 232-238. 2006.
- [3] DESQUESNES, M.; DIA, L.M. Mechanical transmission of *T. vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. **Vet. Parasitol.** 119(1): 9-19. 2004.
- [4] DINKA, H.; ABEBE, G. Small ruminants trypanosomosis in the southwest of Ethiopia. **Small Rum. Res.** 57: 239-243. 2005.
- [5] GARCÍA, H.; GARCÍA, M.E.; PÉREZ, G.; BETHENCOURT, A.; ZERPA, E.; PÉREZ, H.; MENDOZA-LEÓN, A. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. **Annals of Trop. Med. and Parasitol.** 100: 297-305. 2006.
- [6] GARCÍA, H.; GARCÍA, M.E.; PÉREZ, H.; MENDOZA L.A. The detection and PCR-based characterization of parasites causing trypanosomiasis in water buffalo herds in Venezuela. **Annals of Trop. Med. and Parasitol.** 99: 359-370. 2005.
- [7] GARCÍA, H.; GARCÍA, M.E.; ZERPA, H.; PÉREZ, G.; CONTRERAS, C.; PIVAT, I.; MENDOZA, L. A. 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, Vene-

- zuela. **Rev. de la Fac. de Cs Vet. UCV.** 42: 131-144. 2003.
- [8] GEYSEN, D.; DELESPAUX, V.; GEERTS, S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. **Vet. Parasitol.** 110: 171-180. 2003.
- [9] KALU, A.U.; OBOEGBULEM, S.I.; UZOUKWU, M. Trypanosomosis in small ruminants maintained by low riverine tsetse population in central Nigeria. **Small Rum. Res.** 40: 109-115. 2001.
- [10] MASAKE, R.A.; MAJIWA, P.A.; MOLOO, S.K.; MAKAU, J.M.; NJUGUNA, J.T.; MAINA, M.; KABATA, J.; OLEMOIYOI, O.K.; NANTYULYA, V.M. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. **Exp. Parasitol.** 83: 193-205. 1997.
- [11] NG'AYO, M.O.; NJIRU, Z.K.; KENYA, E.U.; MULUVI, G.M.; OSIR, E.O.; MASIGA, D.K. Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya: important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness? 2005. **Kinetoplastid Biology and Disease.** 4:5. BioMed Central – United Kingdom. On-Line: <http://www.kinetoplastids.com/content/20/07/2007>.
- [12] RIVERA, M.A. Tripanosomiasis. **Hemoparasitosis Bovinas.** Caracas: Universidad Central de Venezuela. 237 pp. 1996.
- [13] SHARMA, D.K.; CHAUHAN, P.P.; SAXENA, V.K.; AGRAWAL, R.D.; Haematological changes in experimental trypanosomiasis in Barbari goats. **Small Rum. Res.** 38: 145-149. 2000.
- [14] SINSHAW, A.; ABEBE, G.; DESQUESNES, M.; YONI, W. Biting flies and *Trypanosoma vivax* infection in three highland districts bordering lake Tana, Ethiopia. **Vet. Parasitol.** 142: 35-46. 2006.
- [15] SUÁREZ, C.; GARCÍA, F.; BALDIZÁN, G.; VALLE, A. Alteraciones en la coagulación en ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de *Trypanosoma vivax*. **Rev. de la Fac. de Cs. Vet – UCV.** 44: 37-48. 2003.
- [16] THRUSFIELD, M. Descripción de la presentación de la enfermedad. **Epidemiología Veterinaria.** Editorial Acribia, Zaragoza-Spain. Pp. 39-58. 1990.
- [17] TILLEY, A.; HIDE, G. Characterization of *Trypanosoma brucei* stocks using PCR-RFLP analysis of ribosomal internal transcribed spacer (IRT). **Annals of Trop. Med. and Parasitol.** 95: 617-621. 2001.
- [18] TORO, M. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. In: **Hemoparásitos. Biología y Diagnóstico.** Giardina, S. y García, F. (Eds) Caracas: Universidad Simón Bolívar. 33 - 51 pp. 1990.
- [19] VALERA, Z.; PARRA, O.; ALVARADO, M.; BARBOZA, G.; ESCALONA, F.; RAMÍREZ, R. Efecto de la infección experimental con *Trypanosoma vivax* sobre parámetros hematológicos en ovinos. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XV (5): 412-420. 2005.
- [20] WOO, P.T.K. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Can. J. of Zool.** 47: 921-923. 1969.
- [21] WUYTS, N.; CHOKESAJJAWATEE, N.; SARATAPHAN, N.; PANYIN, S. PCR amplification of crude blood on microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in dairy cattle. **Annales de la Soc. Belge de Méd. Trop.** 75: 229-237. 1995.