

# SEROPOSITIVIDAD A *Trypanosoma evansi* EN CABALLOS CRIOLLOS INFECTADOS NATURALMENTE EN TRES HATOS DEL ESTADO APURE

## Seropositivity to *Trypanosoma evansi* in Creole Horses Naturally Infected in Three Ranches of Apure State

María Forlano<sup>1</sup>, Roy Meléndez<sup>1\*</sup> y José Luís Canelón<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria. Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV), Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Núcleo "Tarabana", Edif. "B", piso 2. Cabudare, Lara. Venezuela. Tlf. 0251-2592437.

<sup>2</sup> Cátedra Libre del Caballo Criollo Venezolano. Decanato de Ciencias Veterinarias, UCLA, Núcleo "Tarabana", Edif. "B", piso 3. Cabudare, Lara. Venezuela. \*E-mail: empleomatic@hotmail.com

### RESUMEN

La tripanosomosis equina es una enfermedad estacional y enzootica en algunos Estados de Venezuela, causando alta morbilidad y baja mortalidad en rebaños de caballos ubicados particularmente en los Llanos venezolanos. El objetivo central de este trabajo fue determinar por medio de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y un ensayo inmunoenzimático (ELISA), la seropositividad al *Trypanosoma evansi* en sueros sanguíneos obtenidos de caballos raza Criollo Venezolano de tres hatos del estado Apure. Todas las muestras de sangre fueron previamente procesadas para diagnosticar infección activa a *T. evansi* mediante las técnicas de Woo y preparación de frotis coloreados con Giemsa. Además se relacionó la seropositividad a *T. evansi* por IFI y por ELISA, con la edad y sexo de los caballos. Para ello se extrajo sangre yugular de 277 caballos del estado Apure y los sueros se procesaron, tanto por IFI como por ELISA. La seroprevalencia a *T. evansi* por IFI para estos caballos fue del 40% y del 26,3% por ELISA. No se detectó infección activa en ninguno de los caballos muestreados. La mayor cantidad de equinos seropositivos a *T. evansi* estuvo en el grupo etario >3 años y la menor cantidad correspondió al grupo de potros o caballos menores de 1 año de edad; en los 3 grupos etarios, las yeguas mostraron un mayor número de animales seropositivos a *T. evansi* que los machos, sin embargo no se detectaron diferencias significativas ( $P>0,05$ ) entre los tres grupos etarios en relación a la seropositividad. Los caballos Criollo Venezolano parecen presentar una resistencia

innata o adquirida a infecciones por *T. evansi*, ya que la seropositividad global diagnosticada a *T. evansi* fue relativamente baja comparada con la publicada anteriormente en la literatura nacional para caballos en Apure y porque no se detectaron casos de infección activa a *T. evansi* en las muestras de sangre extraídas, no obstante convivir estos caballos en un ambiente agroecológico enzootico a esta enfermedad.

**Palabras clave:** *Trypanosoma evansi*, caballo raza Criollo Venezolano, IFI, ELISA.

### ABSTRACT

Equine trypanosomosis is an enzootic and seasonal disease in some States of Venezuela, which causes high morbidity and low mortality in horse herds particularly in those located at the Venezuelan Llanos. The main objective of this work was to assess by an indirect immunofluorescent assay (IFA), and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the seropositivity to *Trypanosoma evansi* in sera samples collected from Creole horses located at three ranches in Apure State. All blood samples were previously checked for *T. evansi* active infection by the Woo's technique and by examination of Giemsa stained blood films. In addition, the seropositivity to *T. evansi*, both by IFA or ELISA, was related to the age and sex of these equines. Thus, blood samples were drawn from the jugular vein of 277 horses at Apure State, and sera samples were processed by IFA and ELISA. The seroprevalence to *T. evansi* for horses at Apure was 40% by IFA, and 26.3% by ELISA. Active infection to *T. evansi* was detected in none of the blood samples. The largest amount of seropositive horses to *T. evansi* was in the

group over 3 years old, whereas the lowest amount was in the group horses under 1 year old; among the three age groups mares showed the largest amount of seropositive animals to *T. evansi* compared with the male ones, nonetheless, significant differences ( $P>0.05$ ) were not detected among the three years age groups when related to the seropositivity. Horses of the Venezuelan Creole breed appear to show some innate or acquired resistance to infections to *T. evansi* since their total seropositivity was relatively lower after comparing it with that previously published for horses at Apure State ranches, and because none *T. evansi* was diagnosed in any fresh blood samples of these equines causing active infection, nevertheless these horses daily stay at enzootic zones for this disease.

**Key words:** *Trypanosoma evansi*, Venezuelan Creole horses, IFA, ELISA.

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma evansi* (Protozoa: Kinetoplastida) es un microorganismo flagelado hemoparásito de caballos (*Equus caballus*), perros (*Canis familiaris*), camellos (*Camelus* spp.), búfalos (*Bubalus bubalis*), chiguirenses (*Hydrochoerus hydrochaeris*) y roedores de laboratorio como ratones (*Mus musculus*), ratas (*Rattus* spp.), cobayos (*Cavia porcellus*) y conejos (*Oryctolagus* spp.) [5, 17]. En los équidos causa una grave enfermedad febril, con anemia severa, enflaquecimiento, edemas en extremidades y región ventral, anorexia, debilidad general y parálisis del tren posterior, esta enfermedad ha sido diagnosticada en diversas regiones tropicales y subtropicales del mundo [5, 17]. *T. evansi* fue el primer tripanosoma patógeno diagnosticado en animales domésticos y ello ocurrió en 1880 en la India en caballos y camellos [5].

La enfermedad en équidos se denomina actualmente tripanosomosis equina pero también ha recibido nombres regionales o coloquiales como “surra”, en India, “mal de caderas” en Brasil y Argentina o “derrengadera equina” en Venezuela.

El primer diagnóstico de *T. evansi* y de la tripanosomosis equina en Venezuela fue realizado por Rafael Rangel en 1905 en un brote ocurrido en caballos de la región El Rastro, estado Guárico [15], no obstante, se estima que el *T. evansi* había llegado a Venezuela entre 1815 y 1820 en la sangre de la caballería del General español Pablo Morillo [2].

El *T. evansi* es el tripanosoma de mayor distribución mundial y ha sido diagnosticado en América, Europa, África y en diversos países de Asia [7, 8], excepto en Australia e islas oceánicas. En Brasil, brotes frecuentes de tripanosomosis equina han sido diagnosticados en la zona sureña de Pantanal Mato-Grossense causando morbilidad y mortalidad considerable en los equinos infectados [18] y en el norte de Argentina esta enfermedad es un problema de salud animal en rebaños equinos en primavera y verano [12].

El diagnóstico de la tripanosomosis equina se ha logrado de diversas maneras: 1) por el cuadro clínico que presentan los animales enfermos, 2) mediante el uso de técnicas parasitológicas directas orientadas a ver microscópicamente *T. evansi*, 3) por técnicas indirectas de inmunodiagnóstico y 4) más recientemente usando técnicas de biología molecular [8].

Los signos y síntomas clínicos en esta enfermedad son similares a los que se presentan en otras hemoparasitosis, por ende, el diagnóstico de la tripanosomosis equina basado sólo en el cuadro clínico se puede prestar a confusión con otras enfermedades, no obstante, lo podría hacer clínicamente un veterinario con experiencia de campo. A su vez, las técnicas standard de laboratorio para diagnosticar *T. evansi* son: detectar el *T. evansi* en examen microscópico directo de sangre equina, técnicas de concentración como la técnica de Woo o del microhematocrito y pruebas biológicas mediante inoculación de *T. evansi* en roedores sensibles, pero tienen la limitante de poseer baja sensibilidad y ésta depende del grado de parasitemia que tenga el animal a diagnosticar [11, 14].

Las técnicas de inmunodiagnóstico de uso común para la tripanosomosis son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la técnica de inmunoensayo enzimático o ELISA [3, 16, 20], las cuales no detectan al parásito sino anticuerpos anti-*T. evansi* que la infección ocasionó [3, 16, 20]. Estas dos técnicas dan un diagnóstico presuntivo, ya que sólo dicen que el animal estuvo infectado con *T. evansi* y no diferencian si el equino tuvo una infección reciente o crónica. Sin embargo, las técnicas de inmunodiagnóstico presentan gran utilidad para estudios epidemiológicos de enfermedades en una región o en un país, en un tiempo dado [8] y son usadas frecuentemente por tener una alta sensibilidad y especificidad [9, 11].

En Venezuela se han establecido, en particular en los llanos venezolanos, rebaños o atajos autóctonos de caballos de la raza Criollo Venezolano (CV) los cuales son esenciales para las faenas de arreo y recolección de bovinos (*Bos taurus* o *Bos indicus*), para la producción y consumo de carne en el país, y como medio de transporte y carga en el medio rural; se presume que los equinos CV, gracias a su rusticidad y su larga permanencia en el ecosistema llanero, son más resistentes a enfermedades tropicales (como la tripanosomosis) al compararlos con caballos de otras razas, por ende, las muestras colectadas para este estudio fueron extraídas de caballos raza CV, a fin de evaluar mediante las dos técnicas de inmunodiagnóstico la seropositividad de estos equinos a *T. evansi*. Pocos trabajos sobre seroprevalencia de *T. evansi* en equinos fueron encontrados en la literatura nacional [4, 16], lo cual justifica aun más esta investigación.

El objetivo central de este trabajo fue determinar por medio de las técnicas IFI y ELISA los niveles de seropositividad a *T. evansi* en sueros sanguíneos obtenidos de caballos raza CV ubicados en tres hatos del estado Apure y relacionar la seropositividad a *T. evansi*, diagnosticada por IFI y por ELISA, con la edad y sexo de estos animales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Equinos:** las muestras de sangre de caballos fueron obtenidas de rebaños ubicados en el estado Apure, zona donde hay alto número de caballos raza CV. En total se colectaron 277 sueros de caballos ubicados en los hatos “Los Camarucos” (Alto Apure) LN 07° 45' 46" y LW 69° 03' 27", “Acapulco” y “Las Palmeras” (ambos en Bajo Apure), estos dos últimos hatos están cercanos al pueblo de Mantecal cuyas coordenadas geográficas son: LN 07° 35' 42" y LW 69° 06' 15". Se obtuvo información sobre la edad y sexo de los caballos, estos datos se analizaron para cumplir con el segundo objetivo propuesto. Se establecieron tres grupos etarios: caballos con 0 – 1 año de edad, de 1 a 3 años y caballos mayores de 3 años.

**Toma de muestras:** Las muestras de sangre de cada caballo fueron extraídas de la vena yugular mediante aguja y tubo Vacutainer® al vacío sin anticoagulante, se mantuvieron en cavas con hielo hasta ser llevadas al laboratorio de Parasitología Veterinaria, Decanato de Ciencias Veterinarias Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado (DCV), donde se centrifugaron en una centrífuga clínica (Dynac®, Clay Adams, NJ, EUA) se separaron los sueros sanguíneos y éstos se congelaron a -30 °C en un freezer (Frigidaire, FFU1464DW3; CSA, EUA) hasta su procesamiento por IFI y ELISA. Además, muestras de sangre de la vena marginal auricular de cada caballo fueron colectadas en tubos de microhematocrito para realizarles, directamente en el campo, la técnica de Woo [21] la cual diagnostica hemoparásitos extracelulares al ser observado microscópicamente la zona entre la capa de células blancas y el plasma contenido en el microtubo, previamente centrifugado a 11.000 rpm, y preparar frotis finos coloreados con Giemsa.

**Inmunodiagnóstico:** A fin de determinar la seropositividad a *Trypanosoma evansi* se les aplicó IFI y ELISA a los 277 sueros colectados. La técnica de IFI usada siguió un procedimiento previamente publicado [10], el cual fue modificado para adaptarlo al inmunodiagnóstico de *T. evansi*, en breve se realizó así: la cepa de *T. evansi* utilizada fue aislada de un equino de Mantecal (Apure), denominada cepa “Teva 1”, inoculada en roedores y mantenida criopreservada en laboratorios de la Universidad Simón Bolívar (USB), de donde fue recibida en donación. La cepa fue inoculada intraperitonealmente (0,1 – 0,5 mL) en dos ratas albinas, cepa Sprague-Dawley y cuando la parasitemia alcanzó valores de  $10^6$  –  $10^8$  tripanosomas/mL, se les extrajo sangre por punción cardíaca en presencia de EDTA al 15% y con esta sangre parasitada se realizaron los frotis los cuales se utilizaron como antígeno para la IFI. Estos frotis se mantuvieron congelados a -30 °C hasta su uso, cuando fueron secados por una hora, luego fijados en acetona por 15', secados al aire y sobre los frotis se dibujaron círculos para colocar primero un suero control positivo y un suero control negativo, los cuales previamente habían sido descongelados y diluidos en tampón fosfato salino (PBS) a 1:40. Luego, 50 µL de cada uno de los sueros equino problema, previamente diluidos en PBS a 1:40, fueron colocados en cada círculo de las láminas con el an-

tígeno. Los frotis con los sueros diluidos fueron colocados en estufa por 30' a 37 °C, luego se lavaron dos veces en PBS y en agua destilada, se secaron al aire, y se colocó en cada círculo 50 µL del conjugado diluido en PBS a 1:30. En todas las IFI realizadas se utilizó como segundo anticuerpo el IgG anti-caballo conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), (producto N° F 7759, Sigma, EUA). Los frotis se incubaron por 30' a 37 °C, luego se lavaron dos veces, por 60 segundos en PBS y en agua destilada, se secaron al aire y se observaron en un microscopio para inmunofluorescencia (Leitz ®) usando objetivo 60X. La Técnica de ELISA indirecta aplicada a los 277 sueros equinos es similar a la metodología usada en el Laboratorio del Centro de Biofísica y Bioquímica (IVIC), estado Miranda, y a la publicada por otros autores [13, 16] y en breve se realizó así: los pozos de las microplacas de polivinilo fueron sensibilizados colocando 100 µL con 20 µg/mL de extracto del antígeno de *T. evansi* (cepa “Teva 1”) diluido en buffer carbonato-bicarbonato, pH 9,6 de inmediato las placas fueron colocadas en cámara húmeda a 4 °C toda la noche. Luego, la placa sensibilizada fue lavada 5 veces con 200 µL de NaCl, 150 mM, conteniendo 0,1% de Tween 20 en cada pozo. Luego se colocó 200 µL/pozo de solución bloqueadora (leche descremada al 5% diluida en PBS) manteniendo la placa en estufa con cámara húmeda (Precision Scientific, PS, Model “Z”; EUA) durante 1 hora a 37 °C. Se lavó la placa como se indicó anteriormente, los sueros problemas se diluyen 1:100 en PBS-T (PBS y 0,1% Tween 20), se colocan 100 µL de cada suero en cada pozo y se incuban durante 1 hora a 37 °C. Se lavó la placa bajo las mismas condiciones arriba indicadas, se agregan 100 µL del conjugado anti equino diluido en buffer PBS-T, 1:100, a cada pozo y se incubó la placa por 1 hora a 37 °C en cámara húmeda, se lavó la placa como se indicó anteriormente, se colocaron 100 µL/pozo del cromógeno (500 mL de 2,2-azino-bis-3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic acid al 2%) (ABTS, Sigma) y se mantuvo la placa en agitación por 45' a temperatura ambiente. Finalmente, la densidad óptica de cada muestra fue leída en un lector ELISA Bio-Rad 350, a 405 nm y 450 nm TMB [13, 16]. El punto de corte fue determinado con el promedio de la densidad óptica (DO) de los sueros negativos controles más dos veces la desviación standard de los negativos.

La seroprevalencia de la tripanosomosis según la técnica de inmunodiagnóstico aplicada a los sueros equinos está expresada en porcentaje luego de dividir el total de animales positivos entre el total de caballos muestreados.

**Prueba biológica:** se realizó en cada uno de los tres hatos muestreados inoculando 1 mL de sangre citratada, obtenida de equinos flacos muestreados, por vía intraperitoneal a cinco ratones de laboratorio (cepa NMRI). Los roedores inoculados se llevaron al laboratorio y diariamente se les tomaba una muestra de sangre de la cola para examen directo y frotis coloreado con Giemsa.

**Análisis estadístico:** Los datos obtenidos por ELISA e IFI fueron analizados en la Unidad de Epidemiología, DCV, a fin de comparar ambas técnicas de inmunodiagnóstico y obtener

sus valores de especificidad, sensibilidad, valor predictivo, así como la seropositividad en los caballos muestreados. Las variables seropositividad a *T. evansi*, sexo y edad de los caballos fueron analizadas con la prueba Z de comparación de proporciones usando el programa Decision Analyst STATS 2.00 [6].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

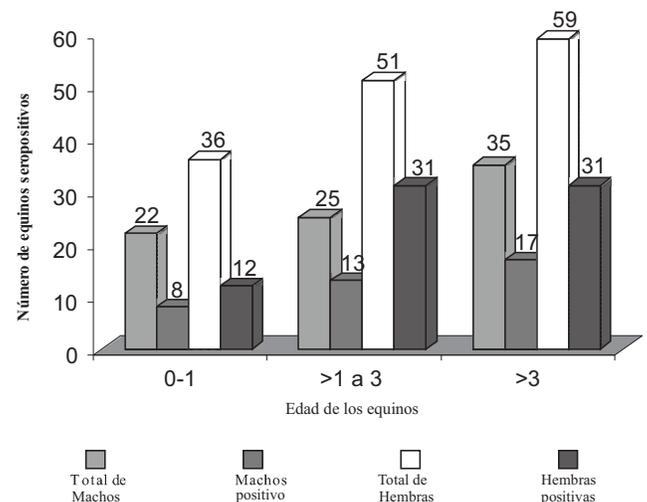
En ningún caso se logró detectar al *Trypanosoma evansi* ni mediante la técnica de Woo o microscópicamente en los frotis coloreados, ni aislarlo luego de inoculación de sangre de caballos a ratones blancos susceptibles, no obstante que los caballos muestreados para la prueba biológica presentaban signos y síntomas sugestivos de la tripanosomosis y que el estado Apure es una región enzoótica a esta enfermedad. Fueron procesados 277 sueros en total, tanto por la técnica de ELISA como por IFI y los resultados de seropositividad obtenidos indican que en los tres hatos muestreados se detectó un mayor número de equinos seropositivos a *T. evansi* mediante la técnica de IFI que con la técnica de ELISA (112 vs. 73).

La seroprevalencia por IFI en los caballos CV muestreados fue del 40% (112/277), mientras que por ELISA la seroprevalencia fue 26,3%. Con los resultados de seroprevalencia obtenidos fue posible determinar y comparar los valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo (VP+) y VP- de IFI vs. ELISA en la tripanosomosis equina. Para hacer esta comparación se usaron los valores siguientes: total de sueros equinos positivos a IFI y a ELISA, número de sueros falsos positivos a ELISA, número de sueros falsos negativos a ELISA y total de sueros negativos, tanto a IFI como a ELISA. Estos datos fueron incluidos en una tabla de 2 x 2 confrontando a IFI con ELISA, de la cual se obtuvieron los siguientes resultados: sensibilidad de IFI: 61,0%, especificidad de IFI: 72,2%, VP+ de IFI: 58,9% y VP- de IFI: 74,0%. La detección de anticuerpos anti-*T. evansi* en 4 de cada 10 caballos CV en la zona muestreada en Apure, hace presumir que estos equinos sufren parasitemias moderadas, las cuales su sistema inmunológico pudiese controlarlas y esos caballos CV pasarían a ser portadores asintomáticos del *T. evansi*. Además, la seroprevalencia obtenida del 40% permite inferir que los caballos CV seropositivos produjeron anticuerpos contra *T. evansi*, respuesta humoral que responde a la variabilidad antigénica desarrollada por tripanosomas de la sección Salivaria [19], la cual le facilita al *T. evansi* la evasión de la respuesta inmunológica del hospedador, conduciendo a estados de tolerancia o resistencia adquirida. Ninguna cepa de *T. evansi* fue aislada de estos animales a pesar de convivir permanentemente los equinos en una zona agroecológica donde en la estación de verano y al inicio de la estación lluviosa hay frecuentes brotes de tripanosomosis equina, incluso con mortalidad de caballos como ha sido reportado por otros autores [4]; además en los Llanos existen vectores y reservorios apropiados para la transmisión efectiva de esta hemoparasitosis [1, 4]. Una seroprevalencia mayor para *T. evansi* fue reportada en equinos mestizos de 3

hatos del estado Apure: 69,3; 60 y 56% respectivamente, utilizando IFI [4]. No se ha realizado un estudio seroepidemiológico nacional sobre la tripanosomosis equina en Venezuela y en la literatura científica sólo se encontraron tres reportes regionales esporádicos [4, 6, 16].

Edad y sexo de los equinos y seropositividad a *T. evansi*: Al graficar los tres grupos etarios de equinos con el número de animales seropositivos por IFI o por ELISA (FIG. 1) se observó que la mayor cantidad de equinos seropositivos a *T. evansi* estuvo en el grupo etario > 3 años mientras que la menor cantidad correspondió al grupo de potros o caballos menores de 1 año de edad, además, en los 3 grupos etarios las yeguas presentaron mayor número de animales seropositivos a *T. evansi* que los machos (FIG. 1). El análisis estadístico de las variables seropositividad, sexo y edad de los caballos muestreados, mediante la prueba Z de comparación de proporciones demostró que no había diferencias significativas entre estas variables,  $P > 0,05$ .

Con relación a las técnicas de inmunodiagnóstico usadas se puede inferir que IFI muestra más confianza o seguridad para diagnosticar a equinos negativos a *T. evansi* (Valor Predictivo Negativo: 74%) que para diagnosticar a los positivos. A su vez, la especificidad detectada para la técnica IFI es aceptable, 72,2%, lo cual indica que reduce el número de falsos positivos. En general la ELISA es la prueba standard para el inmunodiagnóstico de varias hemoparasitosis y esto ha sido demostrado por otros autores [9], quienes señalan que ELISA tiene una sensibilidad del 94,3% para tripanosomiasis por *T. congolense* en bovinos (*Bos taurus*) y cabras (*Capra hircus*) y en Argentina donde obtuvieron con ELISA una sensibilidad entre el 63% y el 100% en brotes de *T. evansi* [11]. El grupo etario en caballos con edad >3 años y de sexo hembra presentó el mayor número de equinos seropositivos a *T. evansi*, esto se



**FIGURA 1. SEROPOSITIVIDAD A *T. evansi* EN CABALLOS RAZA CRIOLLO VENEZOLANO, EN TRES HATOS DEL ESTADO APURE, RELACIONADA A SU SEXO Y EDAD.**

puede explicar porque estos equinos, por razones de trabajo en los hatos y de crianza de potros pasan mayor tiempo en los potreros y en el medio ambiente donde hay alto número de vectores y reservorios de *T. evansi*.

## CONCLUSIONES

La seroprevalencia detectada a *T. evansi* en equinos raza Criollo Venezolano en tres hatos del estado Apure fue del 40% por la técnica de IFI y 26,3% por ELISA.

El grupo etario de caballos con edad > 3 años y de sexo hembras presentaron el mayor número de equinos seropositivos a *T. evansi*.

El no diagnosticar infección activa a *T. evansi* en ninguno de los caballos muestreados y la baja seropositividad detectada en estos equinos reflejaría que la raza Criollo Venezolano desarrolla una resistencia innata o adquirida a infecciones por *T. evansi*.

## AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA) por el financiamiento dado a esta investigación en el proyecto 010-VE-2005. A la Coordinación de Investigación del Decanato de Ciencias Veterinarias, Núcleo "Tarabana", Cabudare, por el apoyo administrativo y logístico dado a este trabajo. Al personal del laboratorio del Centro de Biofísica y Bioquímica, IVIC, estado Miranda, donde fue realizada la técnica de ELISA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARIAS, J. F.; GARCÍA, F.; RIVERA, M.; LÓPEZ, R. *Trypanosoma evansi* in Capibara from Venezuela. **J. Wild. Life. Dis.** 33 (2): 359 – 361. 1997.
- [2] CANELÓN, J. L.; MELÉNDEZ, R. D. Posible origen del *Trypanosoma evansi* en Venezuela. **Vet. Trop.** 28 (2): 155 – 167. 2003.
- [3] FRANKE, C. R.; GREINER, M.; MEHLITZ, D. 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(2): 159-169. 1994.
- [4] GARCÍA, F.; RIVERA, M.; ORTEGA, M.; SUÁREZ, C. Trypanosomiasis equina causada por *Trypanosoma evansi* en tres hatos ganaderos del Estado Apure, Venezuela. **Rev. Fac. Cs. Vet. UCV.** 41 (5): 91-100. 2000.
- [5] HOARE, C. A. The Salivarian (subgenus *Trypanozoon*). In: **The Trypanosomes of Mammals: a zoological monograph.** Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K. 555-593 pp. 1972.
- [6] ILUKEVICH, M. Contribución al estudio de la tripanosomiasis del ganado caballar en los Llanos venezolanos. **Rev. Vet. Venez.** 3 (12): 3-42. 1957.
- [7] LUCKINS, A. G. *Trypanosoma evansi* in Asia. **Parasitol. Today**, 4 (5): 137-142. 1988.
- [8] LUCKINS, A. G. Methods for diagnosis of trypanosomiasis in livestock. 2008. Food and Agriculture Organization (FAO). En línea: <http://www.fao.org/DO-CREP/U6600TOA>. HTML. 08-12-2008.
- [9] MASAKE, R. A.; NANTULYA, M. Sensitivity of an antigen detection enzyme immunoassay for diagnosis of *Trypanosoma congolense* infections in goats and cattle. **J. of Parasitol.** 77 (2): 231-236. 1991.
- [10] MONTENEGRO-JAMES, S.; JAMES, M. A.; RISTIC, M. Modified indirect fluorescent antibody test for the serodiagnosis of *Anaplasma marginale* infections in cattle. **Am. J. Vet. Res.** 46: 2401-2403. 1985.
- [11] MONZÓN, C. M.; MANCEBO, O. A.; ROUX, J. P. Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. **Vet. Parasitol.** 36 (1-2): 141-146. 1990.
- [12] MONZÓN, C.M.; JARA, A.; NANTULYA, V.M. Sensitivity of antigen ELISA test for detecting *Trypanosoma evansi* antigen in horses in the subtropical area of Argentina. **J. of Parasitol.** 81 (5): 806-808. 1995.
- [13] MONZÓN, C.M.; MANCEBO, O.A.; RUSSO, A.M. Antibody levels by indirect ELISA test in *Trypanosoma evansi* infected horses following treatment with quinapyramine sulphate. **Vet. Parasitol.** 111 (1): 59-63. 2003.
- [14] NANTULYA, V.M. Trypanosomiasis in domestic animals: the problem of diagnosis. Office International des Epizooties. **Rev. Scient. Techniq.** 9: 357-367. 1990.
- [15] RANGEL, R. Nota preliminar sobre la peste boba y la derrengadera de los equídeos de los Llanos de Venezuela (trypanosomiasis). **Gac. Med. Caracas**, 12: 105-112. 1905.
- [16] REYNA-BELLO, A.; GARCÍA, F.; RIVERA, M.; SANSÓ, B.; ASO, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. **Vet. Parasitol.** 80: 149-157. 1998.
- [17] ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. Kinetoplasta: Trypanosomes and their kin. **Foundations of Parasitology.** McGrawHill International Editions. Biological Series. Boston, USA. 670 pp. 2000.
- [18] SILVA, R. A. M. S.; AROSEMENA, N. A. E.; HERRERA, H. M.; SAHIB, C. A.; FERREIRA, M. S. J. Outbreak of

- trypanosomosis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-Grossense, Brazil. **Vet. Parasitol.** 60: 167-171. 1995.
- [19] TIZARD, I. Inmunidad contra los parásitos. En: **Inmunología Veterinaria**. 4<sup>a</sup> Ed. Interamericana.McGraw-Hill. México. 344-360 pp. 1995.
- [20] WERNERY, U.; ZACHARIAH, R.; MUMFORD, J. A.; T. LUCKINS. Preliminary evaluation of diagnostic tests using horses experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. **The Vet. J.** 161 (3): 287-300. 2001.
- [21] WOO, P. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Can. J. Zool.** 47 (5): 921-923. 1969.