

**PREVALENCIA DE *Trypanosoma* spp. MEDIANTE ELISA E INMUNOFLUORESCENCIA  
INDIRECTA EN TRES REBAÑOS DE BÚFALOS DE AGUA  
DEL ESTADO COJEDES, VENEZUELA**

**Prevalence of *Trypanosoma* spp. by ELISA and Indirect Fluorescent Antibody Test  
in Three Water Buffaloes Herds from the State of Cojedes, Venezuela**

Angélica M. Bethencourt<sup>\*1</sup>, Herakles A. García<sup>\*</sup>, Arlett M. Pérez<sup>\*</sup>, María E. García<sup>\*</sup>,  
Jessica J. Quijada<sup>\*</sup>, Pedro Cabrera<sup>\*\*</sup>, Isis H. Vivas<sup>\*\*\*</sup>, Mariana C. Eleizalde<sup>\*\*\*\*</sup> y  
Armando Reyna-Bello<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Cátedra de Parasitología, <sup>\*\*</sup>Cátedra de Reproducción Animal y Biotecnología,  
<sup>\*\*\*</sup>Cátedra de Estadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563,  
Maracay 2101, estado Aragua, Venezuela, <sup>\*\*\*\*</sup>Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, Instituto de Estudios  
Científicos y Tecnológicos, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez.  
Apartado 479245, Caracas 1041, Distrito Capital, Venezuela

**Correo-E: angelica.bethencourt@ucv.ve**

Recibido: 01/04/13 - Aprobado: 21/11/13

**RESUMEN**

La tripanosomosis animal es una patología causada por parásitos del género *Trypanosoma*. Esta enfermedad posee una amplia distribución en países tropicales y subtropicales y es determinada por la presencia de moscas hematófagas. Los búfalos de agua son importantes animales domésticos empleados para la producción de leche y carne. Rebaños de búfalos son criados en áreas donde los tripanosomas poseen carácter endémico. En Venezuela, la industria bufalina se ha convertido en una ganadería cada vez más importante y común; sin embargo, animales importados de regiones no endémicas pueden sufrir infección severa. El desarrollo de métodos que garanticen una eficaz vigilancia epidemiológica de la enfermedad posee gran relevancia. Las pruebas inmunológicas son de gran importancia para esta finalidad, particularmente por la poca sensibilidad de los métodos parasitológicos, debido a las bajas parasitemias características en las infecciones subclínicas y crónicas causadas por tripanosomas. Con la finalidad de estimar la prevalencia serológica

**ABSTRACT**

Animal trypanosomiasis is a disease caused by parasites of the genus *Trypanosome*. This malady is widely distributed in many countries, located in tropical and subtropical areas of the world where blood-sucking flies are present. Water buffaloes are important domestic animals used for meat and milk production, and draught power. Buffalo herds are raised in areas where trypanosomiasis is endemic. In Venezuela, the buffalo industry is becoming a very important and common livestock. However, animals imported from non-endemic areas may suffer severe infections. The development of methods which ensure an efficient epidemiological surveillance against this disease is of great relevance. The immunological tests are of great importance for this purpose, because of the low sensitivity of the current parasitological methods, due to the low parasite burden that occur in subclinical and chronic infections caused by trypanosomes. To estimate the serological prevalence of trypanosome in water buffaloes, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used in buffalo samples of healthy

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

de infecciones por tripanosomas en búfalos de agua, fue desarrollado un ELISA que se empleó en muestras de animales clínicamente sanos provenientes de los municipios Rómulo Gallegos, Ricaurte y Girardot del estado Cojedes, Venezuela. Las muestras fueron evaluadas adicionalmente por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por microcentrifugación capilar (TMC). Se procesaron 180 muestras sanguíneas de búfalos, ninguna de las cuales presentó parasitemia activa por TMC. El ELISA determinó una prevalencia de 45,56%, que fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) a la prevalencia obtenida por IFI (28,89%). Al comparar los resultados de los ensayos inmunológicos, se obtuvo un moderado índice de concordancia Kappa: 0,45 (95% CI 0,31-0,58); mientras que el valor de concordancia entre ambas pruebas fue 73,33%. La sensibilidad y especificidad del ELISA, comparado con la IFI, fue de 82,69% y 69,53%, respectivamente. Los valores predictivos positivo y negativo fueron 52,44% y 90,82%, respectivamente. Los resultados sugieren una condición endémica, con moderados valores de infección por *Trypanosoma* spp. en los bufalinos de las regiones evaluadas y demuestran, por primera vez en búfalos de Venezuela, la utilidad del ELISA para estudios epidemiológicos de tripanosomiasis.

**(Palabras clave:** Tripanosomiasis, búfalo de agua, ELISA, inmunofluorescencia, anticuerpos, prevalencia, inmunodiagnóstico, morbosidad, Venezuela)

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores representan un importante obstáculo para la producción animal a nivel mundial. En África, diversas especies de tripanosomas patógenos son encontradas en vectores del género *Glossina* y en animales silvestres. Sin embargo, estas asociaciones milenarias vector-tripanosoma-hospedador han determinado procesos evolutivos de adaptación que se reflejan actualmente en el carácter de reservorio de tripanosomas, conferido a muchos de estos animales silvestres. Una amplia diversidad de la fauna africana alberga tripanosomas sin ningún tipo de manifestación clínica de enfermedad (Van den Bossche et al., 2010). No obstante, la introducción de animales domésticos o el establecimiento de seres humanos

animals from the municipalities of Rómulo Gallegos, Ricaurte and Girardot, in the State of Cojedes, Venezuela. Additionally, samples were also assessed with the indirect fluorescence antibody test (IFAT) and the microhematocrit test (MHCT). A total of 180 blood samples, none of which had an active parasitemia by TMC, were assessed. The prevalence determined by ELISA was 45.56%, which was significantly ( $P < 0.05$ ) higher than that obtained by IFAT (28.89%). The results of the experiments showed a moderate Kappa index of concordance of 0.45 (95% CI: 0.31-0.58); whereas the concordance value for both tests was 73.33%. Both the sensitivity and specificity of ELISA, compared to the IFAT, was 82.69% and 69.53%, respectively. The predictive positive and negative values were 52.44% and 90.82%, respectively. The findings suggest an endemic condition, with moderate infection values caused by *Trypanosoma* spp. in buffaloes from these regions of Venezuela and show, for the first time, the usefulness of ELISA for epidemiological studies of trypanosomiasis.

**(Key words:** Trypanosomiasis, water buffaloes, ELISA, immunofluorescence, antibodies, immunodiagnosis, morbidity, Venezuela)

en dichas regiones resultan en tripanosomiasis severa (enfermedad del sueño, nagana, durina, etc.).

*Trypanosoma vivax*, *T. evansi* y *T. equiperdum*, representan las únicas especies de tripanosomas africanos que dejaron el cinturón de la mosca tsetse en África y se diseminaron exitosamente en diversos continentes. En la actualidad, *T. vivax* se ha reportado en América Central y del Sur, pero no en Asia, Europa ni Australia (Osório et al., 2008). Por otro lado, *T. evansi* muestra una distribución geográfica más amplia que incluye África, América Central y del Sur, Asia, así como España y Francia, donde se han reportado recientemente algunos brotes de enfermedad clínica severa (Reid, 2002; Desquesnes et al., 2008; Tamarit et al., 2010). La tripanosomiasis asociada a ambas especies de parásitos limita la condición de salud de los animales

y por consiguiente sus capacidades de producción de leche y carne.

Entre las especies de tripanosomas que infectan a los búfalos de agua en Venezuela, *T. vivax* es la de mayor importancia debido a su amplia distribución geográfica y patogenicidad (Rivera, 1996; García *et al.*, 2006). Por otro lado, a pesar de que *T. evansi* es altamente prevalente en animales domésticos y silvestres de diversos países de Suramérica (Arias *et al.*, 1997; Herrera *et al.*, 2005), esta especie nunca ha sido reportada en ganado vacuno ni bufalino en Venezuela. De hecho, *T. evansi* es muy poco común en bovinos de Suramérica y solo existen, a la fecha, limitados reportes caracterizados por parasitemias extremadamente bajas en la Amazonia de Brasil, Bolivia y Perú (Dávila *et al.*, 2003; Mekata *et al.*, 2009).

La población total de búfalos de agua en el mundo comprende aproximadamente a 195 millones de animales, asentados mayoritariamente en Asia (FAO, 2013). Sin embargo, la cría de búfalos en Suramérica, África y algunas ciudades europeas se está incrementando aceleradamente debido a las bondades de esta especie en términos de su producción de leche y carne para consumo humano (Borghese y Mazzi, 2005). En Venezuela, la explotación del búfalo de agua se ha incrementado, convirtiéndose en una importante alternativa de producción, con animales importados de Italia, Bulgaria, Bélgica, Brasil y Argentina (Carrero, 2000).

Los rebaños bufalinos que han logrado establecerse en diferentes regiones de Venezuela, en las cuales los tripanosomas son endémicos, han desarrollado a lo largo del tiempo y debido a la exposición constante a estos parásitos una inmunidad adquirida que les confiere gran tolerancia a las manifestaciones clínicas severas de esta patología, a pesar de que sí desarrollan cuadros anémicos importantes (Carrero, 2000; García *et al.*, 2006). Adicionalmente, la potencial introducción de nuevos genotipos de *T. vivax*, cuya virulencia es desconocida, puede desencadenar brotes de enfermedad aguda (Galiza *et al.*, 2011).

El diagnóstico de la tripanosomosis animal frecuentemente se realiza a través de pruebas parasitológicas directas basadas en la observación del parásito. Entre éstas, la evaluación de frotis sanguíneos y la técnica de microcentrifugación capilar (TMC) son las de mayor uso. No obstante, ambas metodologías poseen baja sensibilidad de detección y

baja especificidad (Paris *et al.*, 1982) y no pueden ser mecanizadas, lo que impide el procesamiento simultáneo de numerosas muestras, condición indispensable en estudios epidemiológicos de determinación de infecciones por tripanosomas. Estos métodos generalmente fallan en detectar animales recientemente infectados así como aquellos crónicamente infectados, cuyas parasitemias se caracterizan por ser extremadamente bajas (McManus y Bowles, 1996).

Las pruebas inmunológicas han sido ampliamente utilizadas en estudios epidemiológicos para establecer la prevalencia de la tripanosomosis en diversas regiones del mundo; algunos de estos métodos exhiben una alta sensibilidad y especificidad. García *et al.* (2006), detectaron la presencia de anticuerpos anti-tripanosomas en búfalos de Venezuela mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Sin embargo, esta prueba posee importantes limitaciones relacionadas a la subjetividad de los resultados, debido a que la fluorescencia generada no es cuantificada. Por otra parte, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) no ha sido empleado en la evaluación de las infecciones producidas por *Trypanosoma* en búfalos de agua en Venezuela. El ELISA es un ensayo objetivo (resultado cuantificable), cuyo proceso es totalmente automatizado, de forma tal que pueden procesarse un gran número de muestras de manera simultánea, lo que le confiere una gran ventaja en estudios epidemiológicos (Desquesnes *et al.*, 2009).

Tanto el ELISA como la IFI son pruebas ampliamente utilizadas para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma* spp. en animales (García *et al.*, 2006; Desquesnes *et al.*, 2009). El objetivo de este estudio fue estandarizar una técnica de ELISA para la detección de anticuerpos anti-tripanosomas en búfalos de Venezuela y su aplicación simultánea con un ensayo de IFI, para determinar la prevalencia serológica de la infección, evaluando la utilidad de ambos métodos como herramientas epidemiológicas en la definición de regiones endémicas a tripanosomas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Estandarización del ELISA para el Diagnóstico de Trypanosoma spp.***

La estandarización del ELISA se efectuó siguiendo los lineamientos descritos por Reyna-Bello *et al.* (1998). Se emplearon placas de poliestireno

de 96 pozos cada una (Nunc-Immuno™, Poly Sorp® Surface; fondo redondo). Con la finalidad de lograr las condiciones óptimas del ensayo, se evaluaron diferentes diluciones del antígeno (20 µg/mL, 40 µg/mL), sueros de referencia (1/100, 1/200, 1/400) y del conjugado (1/2000, 1/4000, 1/8000). Este último estuvo representado por un anticuerpo anti-IgG bovina, obtenido en caprinos, acoplado a la enzima peroxidasa (Jackson Immuno Research®) debido a la inexistencia de conjugado comercial anti-IgG de búfalo.

Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con el antígeno (100 µL/pozo) diluido en 0,05 M de tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 durante 18 h a 4°C en cámara húmeda. Como antígeno se empleó un aislado de *T. evansi* obtenido de un caballo con infección natural, proveniente de una región endémica del llano venezolano (Uzcanga et al., 2004; Perrone et al., 2009). Este aislado fue expandido mediante inoculación experimental de ratas albinas (*Sprague Dawley*), siguiendo todos los lineamientos bioéticos para la utilización de animales de experimentación. Cuando la parasitemia alcanzó 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> parásitos/mL, se procedió a recuperar la sangre parasitada y a la posterior purificación de los tripanosomas utilizando columnas de dietil-aminoetil celulosa (DEAE-celulosa), según lo descrito por Lanham y Godfrey (1970). Los parásitos purificados fueron lavados en tres ocasiones consecutivas mediante centrifugación a 1200 g durante 10 min, empleando un de búfer salino fosfato frío (PBS) 0,02 M, pH 7,2, conteniendo 1% de glucosa. Finalmente, los parásitos se resuspendieron en 2 mL de agua destilada y se sometieron a *shock* térmico (congelación en nitrógeno líquido y descongelación en estufa) en cinco ocasiones consecutivas. El homogenizado obtenido se centrifugó a 7000 g por 15 min a 4°C, procediendo a retirar el sobrenadante, el cual fue usado como antígeno en el ELISA, previa determinación de la concentración de proteínas del extracto soluble mediante la aplicación del método de Lowry et al. (1951), haciendo uso del *Kit* de análisis Micro BSA™ (Pierce®).

Una vez que las placas se sensibilizaron con el antígeno de *T. evansi*, se efectuaron cinco lavados de 5 min cada uno empleando 200 µL de solución de lavado en cada pozo (0,15 M de NaCl, con 0,1% de Tween 20), mediante un lavador automático de placas (Wallac, Delfia® *Platewash*). Los mismos cinco procedimientos de lavado antes descritos fueron

empleados después de cada incubación que siguió a cada uno de los procesos del ELISA: bloqueo, aplicación de suero y aplicación del conjugado. Para el bloqueo, se empleó una solución de leche descremada al 5% en 0,02 M PBS, pH 7,2 (200 µL/pozo), aplicada durante 1 h a 37°C en cámara húmeda.

Para evidenciar la presencia de anticuerpos primarios, cada muestra de suero se diluyó en tampón PBS-Tween (0,02 M, pH 7,2, conteniendo 0,1% de Tween 20) y una alícuota (100 µL) de esta dilución se añadió a cada pozo de la placa. Esta fue incubada por 1 h a 37°C en cámara húmeda y posteriormente sometida a cinco lavados de la forma ya descrita. Se procedió a diluir el conjugado en tampón PBS-Tween y a aplicar una alícuota de 100 µL en cada pozo. La placa se incubó y lavó nuevamente como se describió anteriormente, para finalmente adicionar 100 µL de la solución de sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5% + ABTS, *Research Organics*®: 2,2'-azino-bis-3-ácido etilbenzotiazolina-6- sulfónico al 2%, en 0,05 M de tampón citrato, pH 4,0). La placa se colocó en la oscuridad durante 45 min a temperatura ambiente con agitación suave, procediendo luego a la lectura de la densidad óptica (DO) en un lector de ELISA (Bio-Rad®) a 405 nm.

A fin de determinar las mejores condiciones del ELISA, se calculó la razón del promedio de las DO de los sueros de referencia positivos y el promedio de las DO de los sueros negativos. Las diluciones a las cuales la diferencia entre los sueros positivos y negativos fue la mayor, se consideraron como las óptimas para el ELISA, como fue previamente establecido por Reyna-Bello et al. (1998). La determinación del punto de corte del ensayo se realizó a través de la varianza. Durante esta fase de optimización del ELISA fueron empleados 30 sueros de referencia negativos provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela (García et al., 2006). Cada muestra de suero fue procesada por duplicado. Se determinó el promedio de las DO de los sueros negativos ± la desviación estándar (DE). Seguidamente, este valor se empleó como punto de corte para el análisis epidemiológico de las muestras de campo, utilizando la ecuación:  $\bar{X} \pm 3 DE$  (Reyna-Bello et al., 1998).

### **Área de Estudio y Recolección de Muestras Sanguíneas**

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir

de búfalos mestizos machos y hembras de las razas Mediterráneo, Nili Ravi y Murrah, clínicamente sanos, entre dos y ocho años de edad, provenientes de tres fincas ubicadas en los municipios Rómulo Gallegos (n=70), Ricaurte (n=40) y Girardot (n=70) del estado Cojedes (Latitud oeste 08°32', 10°03'; Longitud 67°45', 68°59'), Venezuela. El número de muestras representó entre el 21% y 25% de la población bufalina en las unidades productivas evaluadas, ya que la población animal en cada una de ellas era de 295, 160 y 326 búfalos, respectivamente.

La región en estudio es considerada endémica para los tripanosomas que infectan bovinos, según resultados de investigaciones que se han hecho desde hace más de diez años (García y Mendoza-León 2001; Rivera *et al.*, 2001; García *et al.*, 2003, 2006). El área de estudio se caracteriza por un clima de sabana, grandes extensiones de llanuras pobladas de bosques y sabanas, temperatura media anual de ~26,1°C, coincidiendo los registros máximos (mayo-abril) y mínimo (enero) con los meses secos y húmedos, respectivamente; la precipitación anual promedio varía entre 1300 – 1600 mm. La zona de muestreo se encuentra bajo la influencia de la zona de vida de bosque seco tropical (Jaimes *et al.*, 2006).

Al momento del muestreo, los animales se encontraban en condiciones óptimas de explotación, con planes sanitarios establecidos por el veterinario que asiste dichas fincas, lo que incluía programas actualizados de vacunación y control de parásitos gastrointestinales. Así mismo, una vez al año y desde los últimos tres años, se emplea tratamiento quimioprolifático contra tripanosomosis (solución al 2% de clorhidrato de cloruro de isometamidium, Merial®) y tratamiento basado en aceturato de diminaceno, para aquellos animales sospechosos de infección activa. Para el momento de la toma de las muestras, los animales tenían aproximadamente seis meses sin recibir tratamiento quimioprolifático.

El muestreo se efectuó entre los meses de febrero y marzo de 2008. Los animales se seleccionaron de una forma completamente aleatorizada y el tamaño de la muestra se calculó según la fórmula propuesta por Thrusfield (2005), considerando una prevalencia de tripanosomas en búfalos cercana al 30% (García *et al.*, 2006).

Se recolectaron muestras de sangre total (con EDTA para análisis parasitológico) y muestras sin

anticoagulante para serología. Ambas se obtuvieron por punción de la vena yugular, mediante un sistema de tubos Vacutainer® y agujas estériles 21 x 1 1/2. Las muestras de sangre total fueron mantenidas refrigeradas hasta su evaluación, dentro de las primeras 6 h de su recolección. Las muestras sin aditivos se dejaron coagular a temperatura ambiente y bajo protección de la luz solar (~15 min) e inmediatamente formado el coágulo se transfirieron a refrigeración. El suero sanguíneo se separó en un lapso que nunca excedió las 12 h desde la recolección de la muestra y cada muestra serológica se almacenó y congeló en tubos estériles a -20°C, hasta el día de su procesamiento por ELISA e IFI.

### **Procesamiento de Muestras de Sangre Total para el Diagnóstico de *Trypanosoma* spp. por la TMC**

Las muestras con anticoagulante fueron evaluadas por TMC en un lapso inferior a 6 h luego de su recolección, siguiendo el protocolo descrito por Woo (1969) en tubos capilares (Tecnon®) de 80 µL de capacidad. Cada muestra sanguínea fue evaluada por duplicado. Los capilares se llenaron en ~75% de su capacidad y se centrifugaron a 12000 g por 5 min (IEC Micro-MB). Posteriormente, cada capilar se evaluó directamente sobre la platina de un microscopio (Carl Zeiss, *Standard*) con objetivo 10X y luz común, en busca de movilidad en el área de interfase entre el plasma y la capa de glóbulos blancos (*buffy coat*). Posterior a la centrifugación y previo a la evaluación microscópica del *buffy coat*, se determinó el valor del hematocrito mediante la lectura en una tabla de lectura de microhematocrito Hawksley (Hawksley & Sons, Lancing, UK).

### **Técnica de IFI en el Diagnóstico de *Trypanosoma* spp. en Búfalos de Agua**

Cada muestra de suero sanguíneo se dejó descongelar a temperatura ambiente y una alícuota de 10 µL se usó para la detección de anticuerpos anti-tripanosoma mediante un ensayo de IFI, siguiendo protocolos previamente establecidos (García, 1988; García *et al.*, 2001, 2006). En la preparación de los antígenos para la IFI se utilizaron tripomastigotes sanguíneos de *T. evansi*. Estos parásitos fueron expandidos, colectados y purificados como se explicó anteriormente. Posteriormente, los tripomastigotes fueron fijados en una mezcla de acetona fría y

formalina en tampón PBS (Katende *et al.*, 1987). Como conjugado se usó una molécula completa de inmunoglobulina (IgG) anti bovina obtenida en conejo. Estos anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína fueron adquiridos comercialmente (Sigma®). Como ha sido descrito previamente en ensayos de IFI en búfalos de Venezuela (García *et al.*, 2006), aquellos sueros con títulos de al menos 1:80 fueron considerados positivos. Los sueros de referencia empleados fueron los mismos usados durante la estandarización del ELISA.

### **Evaluación de las Muestras Serológicas Bufalinas por ELISA e IFI para la Detección de Anticuerpos Anti-*Trypanosoma* spp.**

Con la finalidad de detectar anticuerpos anti-tripanosomas, se recolectaron y analizaron por ELISA e IFI un total de 180 muestras de búfalos de agua de las localidades antes definidas. Es importante resaltar que a pesar de que tanto el ELISA como la IFI estuvieron basados en tripomastigotes de *T. evansi* como antígeno, la reactividad cruzada permite obtener, con ambos métodos, resultados positivos ante la presencia de anticuerpos anti-*T. evansi* o anti-*T. vivax* en las muestras de búfalos (Luckins, 1977; Uzcanga *et al.*, 2004; García *et al.*, 2006).

### **Análisis Estadístico**

Los valores de hematocrito se evaluaron estadísticamente a través de una prueba de *t* de Student, mediante el paquete estadístico SAS, con la finalidad de determinar el posible efecto de la presencia de tripanosomas dentro y entre fincas. Se determinó la prevalencia de la infección por cada una de las metodologías de diagnóstico empleadas (TMC, ELISA e IFI), como previamente ha sido descrito (Thrusfield, 2005), así como también una comparación entre el comportamiento del ELISA y la IFI (pruebas inmunológicas cuyo fundamento fue la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma* spp.) mediante un análisis de Kruskal-Wallis, usando el paquete estadístico SAS (1998).

Por ser la primera vez que se desarrolla y utiliza un ELISA en la detección de tripanosomosis en búfalos de Venezuela, se evaluó el comportamiento de dicho ensayo mediante la determinación de los siguientes índices: sensibilidad, especificidad,

valores predictivos positivos y negativos, así como la razón de verosimilitud positiva y negativa, según lo establecido (Thrusfield, 2005). En este sentido, debido a que el ELISA estandarizado estuvo basado en la detección de anticuerpos anti-tripanosomas en los hospedadores, esta técnica se comparó con la IFI como patrón de referencia, ya que esta última técnica además de ser comúnmente usada en el diagnóstico de la tripanosomosis animal en Venezuela, también está basada en la detección de anticuerpos (Arias *et al.*, 1997; Reyna-Bello *et al.*, 1998; García *et al.*, 2001, 2006). Adicionalmente, la baja sensibilidad asociada a los métodos parasitológicos genera grandes dificultades a la hora de analizar el comportamiento de una prueba que está siendo estandarizada.

## **RESULTADOS**

### **Evaluación Parasitológica y Valores de Hematocrito**

La evaluación parasitológica de las 180 muestras de sangre bufalinas mediante la técnica parasitológica de TMC, no permitió identificar ninguna muestra con infección activa en los animales evaluados. El valor promedio de hematocrito de los 180 animales fue de  $37,56 \pm 0,21\%$ , no existiendo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los valores de hematocrito en animales seropositivos y seronegativos, ni entre las tres explotaciones evaluadas.

### **Optimización del ELISA**

Durante la estandarización de las condiciones óptimas del ELISA, se estableció una concentración de antígeno de  $40 \mu\text{g/mL}$ , así como diluciones óptimas del suero y del conjugado de 1/200 y 1/4000, respectivamente. Estas condiciones resultaron en la mayor diferencia (28,07 veces) entre los valores de absorbancia de los sueros de referencia negativos y positivos. El punto de corte del ELISA se estimó mediante varianza y fue establecido como una DO de 0,357.

### **Evaluación Serológica (ELISA e IFI) de las Muestras de Búfalos**

Aunque las muestras empleadas para la detección de anticuerpos anti-tripanosomas provinieron todas del estado Cojedes, estas proceden de diferentes áreas geográficas y de tres unidades de producción modelos en la cría bufalina, en términos de manejo animal y sanitario. Los resultados del ELISA

mostraron una prevalencia serológica general de 45,56% (82/180). La mayoría de las densidades ópticas claramente distinguieron las muestras como positivas o negativas. Estas mismas muestras fueron evaluadas por IFI, resultando una seropositividad de 28,89% (52/180). La prevalencia establecida por la IFI fue significativamente más baja ( $P < 0,05$ ) que la obtenida por ELISA (Tabla 1).

**Tabla 1.** Comparación de los resultados del ELISA e IFI para la detección de anticuerpos anti-tripanosomas en muestras de suero sanguíneo de búfalos de agua del estado Cojedes, Venezuela

ELISA	IFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	43	39	82
Negativo	9	89	98
<b>Total</b>	52	128	180

El comportamiento del ELISA para la detección de anticuerpos anti-tripanosomas utilizando la IFI como patrón de comparación se presenta en la Tabla 2. El ELISA evidenció una sensibilidad del 82,69% y una especificidad relativa del 69,53%. Los valores predictivos positivo y negativo fueron 52,44% y 90,82%, respectivamente.

Del total de muestras serológicas evaluadas por ELISA e IFI, 73,33% mostraron resultados concordantes; mientras que 48 (26,67%) exhibieron resultados diferentes (ELISA-positivo/IFI-negativo o viceversa; Tabla 1). El índice de Kappa fue 0,45 (95% CI 0,31-0,58), mostrando un moderado grado de concordancia entre ambos ensayos. De las 48 muestras serológicas no concordantes, 39 fueron ELISA-positivo/IFI-negativo; mientras que nueve fueron ELISA-negativo/IFI-positivo.

## DISCUSIÓN

El propósito de esta investigación fue estandarizar un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos anti-tripanosomas en búfalos, así como la utilización del mismo como una herramienta epidemiológica para el diagnóstico de tripanosomosis en condiciones naturales de explotación animal y exposición a la infección. Adicionalmente, el ELISA estandarizado fue comparado con la IFI para estimar la prevalencia serológica de *Trypanosoma* spp. en tres rebaños bufalinos del estado Cojedes, Venezuela.

**Tabla 2.** Indicadores de desempeño del ELISA para la detección de anticuerpos anti-tripanosomas en muestras de suero sanguíneo de búfalos de agua del estado Cojedes, Venezuela, empleando los resultados del IFI como referencia

Indicador	Fórmulas*	Valor
Sensibilidad (S)	$VP / (VP + FN)$	82,69
Especificidad (E)	$VN / (VN + FP)$	69,53
Valor predictivo positivo	$VP / (VP + FP)$	52,44
Valor predictivo negativo	$VN / (VN + FN)$	90,82
Razón de verosimilitud positiva	$Se / (1 - E)$	2,71
Razón de verosimilitud negativa	$(1 - Se) / E$	0,25

VP: número de verdaderos positivos, VN: número de verdaderos negativos. FP: número de falsos positivos; FN: número de falsos negativos. \* Thrusfield (2005)

A pesar de que el ELISA es un ensayo totalmente automatizado y cuantitativo, este no ha sido empleado en la detección de infección por tripanosomas en búfalos en Venezuela. El ELISA pudiese tener una gran importancia en el estudio de la tripanosomosis bufalina, al revelar de una manera más precisa que ensayos inmunológicos menos objetivos, la prevalencia real y la distribución geográfica de los animales seropositivos. En consecuencia, tanto las regiones endémicas como las no endémicas, pudiesen ser definidas con precisión.

La evaluación parasitológica de las muestras, por la TMC, no reveló infecciones activas, probablemente debido al adecuado plan sanitario de prevención de tripanosomosis existente en las explotaciones analizadas. Sin embargo, la presencia de animales con infecciones crípticas (parasitemia por debajo del nivel de detección de la TMC) pudiese también explicar estos resultados. En este último escenario, el empleo de métodos de alta sensibilidad como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), pudiera revelar dichas infecciones (García *et al.*, 2003, 2005; Galiza *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista de la seropositividad, los resultados mostraron un importante porcentaje de prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma* spp. en los animales evaluados. Aunque la prevalencia establecida por ELISA e IFI fue estadísticamente diferente ( $P < 0,05$ ), ésta fue considerable por

ambas metodologías (ELISA: ~46%; IFI: ~29%). Adicionalmente, hubo una alta probabilidad (~91%) de que cualquier muestra ELISA-negativa resultase también negativa por la evaluación de la IFI, situación que es importante desde el punto de vista de la identificación de animales negativos en estudios epidemiológicos.

La alta seropositividad a *Trypanosoma* spp. evidenciada en los bufalinos estudiados pudiese ser atribuida a la proximidad entre animales, debido a los hábitos gregarios del búfalo de agua (favoreciendo la transmisión por los vectores) y/o por la presencia de otros rumiantes domésticos en fincas vecinas. Ya que, como ha sido demostrado previamente por García et al. (2009), poblaciones parasitarias genéticamente similares pudiesen estar circulando entre diferentes especies de grandes (búfalos, vacunos) y pequeños rumiantes (ovinos).

Estudios conducidos en Venezuela (ELISA basado en antígenos de *T. evansi*) para la detección de anticuerpos anti-tripanosoma en ganado vacuno, en los estados Guárico y Bolívar, mostraron una prevalencia serológica entre 14 y 42%, respectivamente (Aray et al., 1998; Espinoza et al., 1999). Resultados similares han sido obtenidos en estudios previos de tripanosomosis bufalina en Venezuela mediante IFI, con valores que oscilan entre ~30% y 39% en rebaños comerciales de búfalos, localizados en los estados Falcón, Barinas, Guárico y Cojedes (García et al., 2001; 2006; Tamasaukas et al., 2006). Estos valores están en concordancia con la prevalencia global obtenida en este estudio, empleando tanto la IFI (~29%) como el ELISA (~46%).

Similar a lo reportado previamente, *T. evansi* fue el antígeno de elección para ambas metodologías (IFI/ELISA), fundamentalmente debido a la mayor facilidad para la expansión y purificación de los parásitos durante la preparación de los antígenos. Sin embargo, Wells (1984) estableció que, independientemente de que el antígeno esté basado en tripomastigotes de *T. evansi* o *T. vivax*, la IFI frecuentemente no es una metodología muy específica en la detección de anticuerpos anti-tripanosomas y puede arrojar resultados positivos con anticuerpos surgidos contra diversas especies de tripanosomas y aún contra otros tripanosomatídeos. En consecuencia, las nueve muestras serológicas con resultados IFI-positivo/ELISA-negativo obtenidas en este estudio, pudiesen ser falsos positivos de la IFI.

De manera similar, las 39 muestras con resultados ELISA-positivo/IFI-negativo, las cuales drásticamente afectaron la especificidad y el valor predictivo positivo del ELISA, pudiesen atribuirse a la mayor sensibilidad de esta última técnica, como ha sido demostrado en estudios previos (Desquesnes et al., 2009; Laha y Sasmal, 2009). Independientemente de esta situación, los valores de verosimilitud aquí obtenidos indican la confiabilidad de los resultados del ELISA.

García et al. (2006; 2011) reportan que hasta la fecha en búfalos de agua de Venezuela, solo se ha encontrado infecciones activas por *T. vivax* y *T. theileri*. El parásito *T. theileri* de ganado vacuno posee una muy amplia distribución geográfica a nivel mundial. Sin embargo, los anticuerpos contra esta especie de protozooario no aparentan interferir con los resultados del ELISA o IFI en la detección de anticuerpos anti-*T. evansi* o anti-*T. vivax* en vacunos (Desquesnes y Gardiner, 1993). Aunque el *T. theileri* de vacunos y *T. theileri*-“like” de búfalos de agua son genotipos filogenéticos diferentes (García et al., 2011), ellos pertenecen al subgénero *Megatrypanum* y son parásitos estrechamente relacionados. Se requieren estudios adicionales para dilucidar si los anticuerpos contra *T. theileri*-“like” de búfalos pudiesen interferir con los resultados de la IFI o el ELISA.

Por otro lado, los búfalos de agua son altamente susceptibles a la infección por *T. evansi*. En Asia, esta especie de tripanosoma parece ser la de mayor frecuencia de infección y patogenicidad en búfalos (Löhr et al., 1986; Hilali et al., 2006; Laha y Sasmal, 2009). En fincas de búfalos de Venezuela es frecuente la existencia de équidos domésticos (caballos, asnos, mulas) y roedores silvestres (chigüires) compartiendo un mismo ambiente. Todos estos animales son altamente susceptibles a las infecciones por *T. evansi* (Arias et al., 1997; Reyna-Bello et al., 1998; García et al., 2003). No obstante, *T. evansi* nunca ha sido detectado en búfalos de agua de Venezuela, aún cuando se han empleado ensayos moleculares muy sensibles basados en PCR (García et al., 2006).

Los resultados de esta investigación claramente describen una condición endémica de los tripanosomas que infectan a los búfalos de agua en la región evaluada. La hipótesis más probable es que esta condición endémica sea debida a la transmisión

efectiva de tripanosomas que se sucede en estas áreas, como ha sido sugerido en trabajos previos (García y Mendoza-León 2001; Rivera *et al.*, 2001; García *et al.*, 2003, 2006, 2009).

Estos resultados sugieren la necesidad de evaluar mediante técnicas como el ELISA el estatus de anticuerpos para *Trypanosoma* spp. de los animales que serán introducidos hacia regiones donde los tripanosomas poseen alta frecuencia, así como el de aquellos que serán movilizados desde estas regiones hacia áreas libres y que potencialmente pudiesen albergar infecciones subclínicas, evitando de esta forma la aparición de brotes. La ausencia de infección activa puede deberse a la existencia de animales crípticamente infectados, evidenciables por el uso de métodos de PCR u otros altamente sensibles. Animales con este tipo de infección son de gran relevancia en la epidemiología y en el desarrollo de brotes severos de tripanosomosis animal (Galiza *et al.*, 2011; Cadioli *et al.*, 2012).

## CONCLUSIONES

Los rebaños bufalinos evaluados, provenientes de los municipios Rómulo Gallegos, Ricaurte y Girardot del estado Cojedes, mostraron prevalencias por IFI de 28,89% y por ELISA de 45,56%. Ninguna de las 180 muestras, presentó parasitemia activa por TMC.

Las condiciones óptimas del ELISA fueron: 40 µg/mL de antígeno (*T. evansi*), así como diluciones del suero bufalino y del conjugado anti-bovino 1/200 y 1/4000, respectivamente.

El valor de concordancia entre ambas pruebas fue 73,33%; mientras que la sensibilidad del ELISA con respecto a la IFI, fue de 82,69% y la especificidad de 69,53%. Los valores predictivos positivo y negativo fueron 52,44% y 90,82%, respectivamente.

Los resultados del presente estudio muestran que tanto la IFI como el ELISA son excelentes métodos para estudios epidemiológicos que procuran establecer la prevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma* spp. en búfalos de agua bajo condiciones naturales de explotación.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan especial agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico

(CDCH) de la Universidad Central de Venezuela, por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto: PG-11-00-5917-2005. Agradecemos también al Prof. Dr. Jesús Rojas, de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV, por la lectura crítica del manuscrito.

## REFERENCIAS

- Aray, C.; Uzcanga, G.; Soto, H.; Mendoza, M. 1998. Ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina causada por *Trypanosoma* sp. Seroprevalencia en el municipio Monagas del estado Guárico-Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ*, 8:114-116.
- Arias, J.F.; García, F.; Rivera, M.; López, R. 1997. *Trypanosoma evansi* in capybara from Venezuela. *J. Wild. Dis.*, 33:359-361.
- Borghese, A.; Mazzi, M. 2005. Buffalo population and strategies in the world. In: *Buffalo Production and Research*. Borghese, A. (Ed.). Reu Technical Series 67. FAO. Roma, Italia. Chapter I: 1-39.
- Cadioli, F.A.; Barnabé, P.A.; Machado, R.Z.; Teixeira, M.C.; André, M.R. 2012. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 21:118-124.
- Carrero, J. 2000. Búfalo Asiático. Un recurso inexplorable para producir proteína animal. Editorial Lito Formas, Venezuela. 210 p.
- Dávila, A.M.; Herrera, H.M.; Schlebinger, T.; Souza, S.S.; Traub-Cseko, Y.M. 2003. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Vet. Parasitol.*, 117:1-13.
- Desquesnes, M.; Bossard, G.; Patrel, D.; Herder, S.; Patout, O.; Lepetitcolin, E.; Thevenon, S.; Berthier, D.; Pavlovic, D.; Brugidou, R.; Jacquiet, P.; Schelcher, F.; Faye, B.; Touratier, L.; Cuny, G. 2008. First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France. *Vet. Rec.*, 162:750-752.
- Desquesnes, M.; Kamyngkird, K.; Pruvot, M.; Kengradomkij, C.; Bossard, G.; Sarataphan, N.; Jittapalapong, S. 2009. Antibody-ELISA for *Trypanosoma evansi*: application in a serological survey of dairy cattle, Thailand, and validation of a locally produced antigen. *Prev. Vet. Med.*, 90:233-241.
- Desquesnes, M.; Gardiner, P. 1993. Épidémiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane Française. *Rev. d'Éle. Méd. Vét. Pays Trop.*, 46:463-470.

- Espinoza, E.; González, N.; Perrone, T.; Aso, P.; Hidalgo, L.; Barasarte, L. 1999. Aplicación del ensayo inmunoenzimático (ELISA-Ac/*T. evansi*) para la detección de anticuerpos anti *Trypanosoma vivax* en el estado Bolívar. *Vet. Trop.*, 24:47-53.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. FAOSTAT. Resumen estadístico: población de búfalos 2011 [en línea]. Dirección URL: [http://faostat3.fao.org/home/index\\_es.html](http://faostat3.fao.org/home/index_es.html) [Consulta: 22 de Mar. 2013].
- Galiza, G.J.; García, H.A.; Assis, A.C.; Oliveira, D.M.; Pimentel, L.A.; Dantas, A.F.; Simões, S.V.; Teixeira, M.M.; Riet-Correa, F. 2011. High mortality and lesions of the central nervous system in trypanosomosis by *Trypanosoma vivax* in Brazilian hair sheep. *Vet. Parasitol.*, 182:359-363.
- García, F.A. 1988. Infección experimental de caballos con *Trypanosoma evansi* (= *T. venezuelense*). Aspectos patológicos y antigénicos. Tesis de Maestría. Postgrado en Biología Celular. Facultad de Ciencias. Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela, 110 p.
- García, H.A.; Aguirre, A.; Pérez, G.; Mendoza-León, A. 2001. Diagnóstico parasitológico y serológico de Infecciones por *Trypanosoma* sp. en dos rebaños bufalinos (*Bubalus bubalis*) del estado Guárico. *Rev. Fac. Cs. Vet. UCV*, 42:15-26.
- García, H.A.; Mendoza-León, A. 2001. Detección de infecciones por *Trypanosoma vivax* en búfalos de agua de Venezuela mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *J. Bras. Patol. (Supl.)*, 37:22.
- García, H.A.; García, M.E.; Zerpa, H.; Zerpa, E.; Pérez, G.; Contreras, C.E.; Vivas, I.; Mendoza-León, A. 2003. 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. *Rev. Fac. Cs. Vet. UCV*, 44:131-144.
- García, H.A.; García, M.E.; Pérez, H.; Mendoza-León, A. 2005. Detection and PCR characterization of parasites causing trypanosomiasis in water buffaloes herds in Venezuela. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 99: 359-370.
- García, H.A.; García, M.E.; Pérez, G.; Bethencourt, A.; Zerpa, E.; Pérez, H.; Mendoza-León, A. 2006. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 100:297-305.
- García, H.A.; Rangel-Rivas, A.; Contreras, I.; García, M.E.; García, F.; Perrone, T. 2009. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruca, estado Apure, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.*, 19:230-237.
- García, H.A.; Rodrigues, A.C.; Martinkovic, F.; Minervino, A.H.; Campaner, M.; Nunes, V.L.; Paiva, F.; Hamilton, P.B.; Teixeira, M.M.G. 2011. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. *Int. J. Parasitol.*, 41:1385-1396.
- Herrera, H.M.; Norek, A.; Freitas, T.P.; Rademaker, V.; Fernandes, O.; Jansen, A.M. 2005. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitol. Res.*, 96:121-126.
- Hilali, M.; Abdel-Gawad, A.; Nassar, A.; Abdel-Wahab, A. 2006. Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.*, 139:237-243.
- Jaimes, C.; Pineda, E.J.; Mendoza, J. 2006. Homogeneidad mesoclimática de algunas zonas de vida de Venezuela. INCI. 31: 772-786. [en línea]. Dirección URL: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442006001100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442006001100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es) [Consulta: 21 de Mar. 2013].
- Katende, J.M.; Musoke, A.J.; Nantulya, V.M.; Goddeeris, B.M. 1987. A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. *Trop. Med. Parasitol.*, 38:41-44.
- Laha, R.; Sasmal, N.K. 2009. Detection of *Trypanosoma evansi* infection in clinically ill cattle, buffaloes and horses using various diagnostic tests. *Epidemiol. Infect.*, 137:1583-1585.
- Lanham, S.M.; Godfrey, D.G. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, 28:521-534.
- Löhr, K.; Pholpark, S.; Siriwan, P.; Leesirikul, N.; Srikitjakarn, L.; Staak, C. 1986. *Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in north-east Thailand. II. Abortions. *Trop. Anim. Health Prod.*, 18:103-108.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275.
- Luckins, A.G. 1977. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of microplate

- enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop. Anim. Health Prod.*, 9:53-62.
- McManus, D.; Bowles, J. 1996. Molecular genetics approaches to parasite identification: their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int. J. Parasitol.*, 26:687-704.
- Mekata, H.; Konnai, S.; Witola, W.H.; Inoue, N.; Onuma, M.; Ohashi, K. 2009. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Infect. Genet. Evol.*, 9:1301-1305.
- Osório, A.L.; Madruga, C.R.; Desquesnes, M.; Soares, C.O.; Ribeiro, L.R.; Costa, S.C. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 103:1-13.
- Paris, J.; Murray, M.; McOdimba, F. 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Tropical.*, 39:307-316.
- Perrone, T.M.; Gonzatti, M.I.; Villamizar, G.; Escalante, A.; Aso, P.M. 2009. Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma* sp. by random amplified polymorphic DNA method. *Vet. Parasitol.*, 161:194-200.
- Reid, S.A. 2002. *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia. *Trends Parasitol.*, 18:219-224.
- Reyna-Bello, A.; García, F.A.; Rivera, M.; Sanso, B.; Aso, P.M. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Vet. Parasitol.*, 80:149-157.
- Rivera, M.A. 1996. Hemoparasitosis Bovinas. Anauro Ediciones, Caracas, Venezuela, 237 p.
- Rivera, M.A.; García, F.; León, J.; Albers, M.; Garmendia J.; García, H. 2001. Infecciones activas por *Trypanosoma vivax* en rebaños bovinos de Venezuela. *J. Bras. Patol. (Supl.)*, 37:40.
- SAS. 1998. In: SAS/STAT™ User's guide (Release 6.03 ed). SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Tamarit, A.; Gutiérrez, C.; Arroyo, R.; Jiménez, V.; Zagalá, G.; Bosch, I.; Sirvent, J.; Alberola, J.; Alonso, I.; Caballero, C. 2010. *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. *Vet. Parasitol.*, 167:74-76.
- Tamasaukas, R.; Roa, N.; Cobo, M. 2006. Tripanosomosis por *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalus bubalis*), en dos fincas del estado Guárico, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.*, 16:575-578.
- Thrusfield, M. 2005. Veterinary Epidemiology. 3<sup>rd</sup> ed., UK, Blackwell Science Ltd. 584 p.
- Uzcanga, G.L.; Perrone, T.; Noda, J.A.; Pérez-Pazos, J.; Medina, R.; Hoebeke, J.; Bubis, J. 2004. Variant surface glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the cross-reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochem.*, 43:565-606.
- Van den Bossche, P.; de La Rocque, S.; Hendrickx, G.; Bouyer, J. 2010. A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis. *Trends Parasitol.*, 26:236-243.
- Wells, E.A. 1984. Animal trypanosomiasis in South America. *Prev. Vet. Med.*, 2:31-41.
- Woo, P.T.K. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.*, 47: 921-923.