

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

HEMOPARASITOSIS EN GANADERÍA DOBLE PROPÓSITO VENEZOLANA, DIAGNÓSTICO Y CONTROL: UNA REVISIÓN¹

Rita Tamasaukas², Leonel Agudo-Castellanos², Alba Silva-Ravelo³, Jazmín Florio-Luis⁴,
María Vintimilla-Tamasaukas⁵, Sergio Rivera-Pirela⁶

RESUMEN

Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: Una revisión. Este trabajo de revisión de tesis doctoral incluye resultados de investigaciones realizadas en el periodo 1971 a 2009 sobre cuatro hemoparasitosis causados por protozoarios y rickettsiales en Venezuela y otros países, con énfasis en la infección mixta en rebaños bovinos, y su diagnóstico y control. En Venezuela, las afecciones causadas por agentes hemotrópicos parasitarios están distribuidas en todos los estados del país con vocación ganadera, en especial, en rebaños bovinos y bufalinos. Entre aquellos encontramos a especies del género *Anaplasma* (*Anaplasma marginale*), *Babesia* (*Babesia bigemina* y *B. bovis*), y *Trypanosoma* (*Trypanosoma vivax*), con una frecuencia endémica y con variaciones estacionales.

Palabras claves: Trypanosomosis, Babesiosis, Anaplasmosis, trypanotolerancia.

ABSTRACT

Haemoparasitosis in dual purpose livestock, diagnosis and control: a review. This review comes from a doctoral thesis which includes results of research conducted in Venezuela and the world from 1971 to 2009 about four types of hemoparasitosis caused by protozoans and rickettsias, with special attention on mixed infections in bovine livestock, their diagnosis and control. In Venezuela, affections caused by hemotropic agents are distributed in all states with cattle vocation in the country, especially among bovine and buffaloes herds. Between those we found species of the genus *Anaplasma* (*Anaplasma marginale*), *Babesia* (*Babesia bigemina* and *B. bovis*), and *Trypanosoma* (*Trypanosoma vivax*), which are endemic in the country and show seasonal variations.

Key words: Trypanosomosis, Babesiosis, Anaplasmosis, trypanotolerance.



¹ Recibido: 10 de octubre, 2009. Aceptado: 22 de noviembre, 2010. Tesis Doctoral. Estudio de la Agroecoepidemiología de la Trypanosomosis y su Aplicación para la Evaluación de la Trypanotolerancia a *Trypanosoma vivax* en Bovinos y Búfalos, en Venezuela, Proyectos: BID FONACIT INIA No. 20050008, FONACIT UNERG 20011620.

² Laboratorio de Biotecnología, de Investigación y Prestación de Servicios en Sanidad Animal (LABIPRESAN)-Universidad Nacional Experimental de los Llanos Centrales Rómulo Gallegos (UNERG). San Juan de los Morros, CP 2301. Estado Guárico, Venezuela. Telefax: +58 (0)243-2336040, Celular: +58 (0)416-6454515. tamasaukas.rita@gmail.com; tamasaukas.rita.2010@gmail.com; leoagudo@gmail.com

³ Centro Técnico de Producción Socialista Florentino (CTPSF). Barinas, estado Barinas, Venezuela. albag78@hotmail.com

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas del estado Barinas (INIA Barinas). jazminflorio2010@gmail.com

⁵ Instituto Venezolano de los Seguros Sociales, Maracay, estado Aragua, Venezuela. sagyvintimilla@gmail.com

⁶ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. sergio.rivera54@hotmail.es

INTRODUCCIÓN

En dos fincas de Doble Propósito (DP) en el Municipio de Santa Rita de Manapire del estado Guárico, Venezuela, se determinó el fenómeno de concomitancia de los cuatro hemoparásitos, con valores de *Anaplasma marginale* de 90% (Frotis delgado de capa blanca coloreado, CBC), 85% (Frotis de sangre completa coloreado, FSC), y 60% (Inmunofluorescencia indirecta, IFI) y 65,5% (CBC), 55,5% (FSC) y por IFI 32,5%, en dos fincas bovinas DP a pesar de la diversidad de unidades agroecológicas identificadas, prácticas de manejo de las fincas y la misma época de estudio (Tamasaukas *et al.* 2000b). Se encontraron valores de serorreacores a *T. vivax* por IFI, de 25% y 50%.

El objetivo de esta revisión es exponer resultados de investigaciones realizadas en Venezuela y a nivel mundial, seleccionadas en un periodo de casi 38 años, de 1971 a 2009 de las hemoparasitosis causadas por protozoarios y rickettsiales.

SITUACIÓN ACTUAL DE LAS HEMOPARASITOSIS EN VENEZUELA

Anaplasmosis

En Venezuela, la anaplasmosis es una enfermedad hemoparasítica bovina, causada por la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*, que ocasiona anualmente cuantiosas pérdidas económicas (Cammilli y Caballero 2001). Toro (1990) señalan una seroprevalencia por IFI de 69,9% de *A. marginale* y de *Paranaplasma caudata* de 41,6% en fincas bovinas del Estado Guárico, de un total promedio nacional de 47,6% y 24,8%, respectivamente, siendo el segundo estado de mayor seroprevalencia, después del Estado Zulia, donde reportó valores de 78,7% para *A. marginale* y 28,0% para *P. caudata*, respectivamente.

En tanto que, Alfaro *et al.* (1994a) indicaron una seroprevalencia general del *A. marginale* de 49,54% en un total de 1456 muestras serológicas de bovinos del Municipio Maturín (51,30%) y de 294 provenientes del Municipio Ezequiel Zamora (40,82%) del estado Monagas, sugiriendo una mayor susceptibilidad de los animales adultos para contraer la enfermedad, afectando de manera similar a machos y hembras en una explotación (Alfaro *et al.* 1994b).

En un estudio en el sector La Piñata, municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela, se seleccionaron 12 fincas, con una población de 6894 bovinos, evaluándose 174 muestras por medio de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y la observación de frotis de capa blanca (Díaz *et al.* 2003). Con una prevalencia de 95,4% (IFI); y de 56,9% por frotis, sin encontrar diferencias significativas con relación a la presencia de la rickettsia y el sexo o la edad de los animales. Todas las fincas mostraron prevalencias iguales o mayores a 75%, indicando que la zona estudiada presenta una condición de estabilidad enzoótica para este hemoparásito con bajo riesgo para la ocurrencia de la enfermedad, siguiendo los conceptos emitidos por Carrique *et al.* (2000) y Guglielmo (1992); lo cual indica que *A. marginale* es endémica en la zona estudiada. La técnica de IFI resultó ser más efectiva con relación a la observación de frotis de capa blanca en la detección de animales infectados con *A. marginale*.

En becerros mantenidos en estabulación (nacidos de madres con parasitemias por *A. marginale* inferiores al 1% para el momento del nacimiento de los animales y no habían sido sometidas recientemente a tratamientos eficaces contra la rickettsia), se observó una prevalencia de 100% de *A. marginale*, con parasitemias entre 1 y 3% a los 30 días de nacidos, a excepción del animal más joven del grupo que presentó parasitemia de 1% a los 17 días de edad. No se observó *A. marginale* en los extendidos sanguíneos evaluados a una semana de nacidos (Rey *et al.* 2003). Si se considera que el periodo pre-patente de la enfermedad es de al menos tres semanas en animales sin esplenectomizar e inversamente proporcional al tamaño del inóculo (Rivera 1996, Wanduragala y Ristic 1993), estos animales pudieron adquirir la infección por vía transplacentaria. Se ha determinado experimentalmente que una vaca afectada por anaplasmosis aguda antes del día 190 de la gestación puede transmitir *A. marginale* en el útero (Zaugg 1985), pero la relevancia de esta transmisión a nivel de campo no ha sido establecida.

La respuesta de anticuerpos contra *A. marginale* del aislado Lara, se determinó en los sueros de animales de siete y 30 días de nacidos. En ambos muestreos se observó que no hubo respuesta significativa de IgM ($p > 0,05$); sólo el suero de un animal fue débilmente positivo. Con relación a la respuesta de IgG en el día siete, un 45% de los sueros evaluados presentó valores

de absorbancia por encima del punto de corte y en el día 30, sólo un 31%. No se detectaron diferencias significativas entre los valores de IgG en los sueros de ambos muestreos, pero sí entre los valores de IgM e IgG de los sueros obtenidos a los siete días de nacidos ($p < 0,05$).

Babesiosis

Sobre Babesiosis Toro (1990) indica para Venezuela, una seroprevalencia por IFI de *B. bigemina* en la región llanera de 64,8% y para *B. bovis* de 55%, con un promedio general para el Estado Guárico de 81,8% para *B. bigemina* y 73,4% para *B. bovis*.

Trypanosomosis

Trypanosoma (Duttonella) *vivax* Ziemann (1905), es el agente causal de una de las más importantes formas de trypanosomosis en animales ungulados silvestres y domésticos: bovinos, búfalos, cabras, ovejas, camellos y ciervos de países tropicales y subtropicales de Asia, África y América (Sandoval *et al.* 1996, Tamasaukas y Roa 1996).

Los datos más actualizados, sobre la valoración de los anticuerpos para *T. vivax* por el método IFI en bovinos DP (Tamasaukas *et al.* 2002; 2006), arrojó los siguientes resultados: una prevalencia relativa general promedio de 60% (valores absolutos de 56,9% en la época lluviosa y 45,7% en la época seca) en fincas ubicadas en los Municipios Ortiz y Roscio del estado Guárico. En ambas épocas el mayor número de casos fue en hembras adultas, 37,1% del total de muestras positivas. El porcentaje de este grupo para época seca fue de 13,7% y 31,5% para época lluviosa y una prevalencia absoluta de 22%. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre épocas ($P > 0,05$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre sexo y grupos etarios, coincidiendo con los reportados por Duno (1992) y Tamasaukas (1995a, b, c; 1998).

En el estado Guárico los estudios conducidos por Tamasaukas y Roa (1991-1992) han mostrado una seroprevalencia del agente causal de esta enfermedad en las regiones centro-sur del oriente del estado de 33,8 % en la época lluviosa y del 3,63 % en la época seca. En búfalos (*Bubalus bubalis*), hay muy pocos reportes sobre esta afección parasitaria (Tamasaukas *et al.* 2006) aunque Silva y Dávila (1997), señalaron la

importancia de la trypanosomosis en estos animales en Brasil, reportada desde la década de los 70 en el estado de Pará y en Pantanal en años más recientes. Hay un creciente interés en Venezuela, Brasil y otros países sudamericanos por evaluar al búfalo de agua como alternativa en la producción pecuaria tropical (Vale 1994), al respecto, Venezuela posee la segunda población bubalina en América Latina después de Brasil y en tercer lugar, Argentina. En Latinoamérica las razas de búfalos en producción pertenecen mayoritariamente a las razas Murrah y Jafarabadi (De Bernardi 2004).

Se ha señalado que cerca de 100 millones de cabezas de búfalos en América del Sur, África y Asia (incluyendo China), corren el riesgo de enfermar por causa de trypanosomas (*T. evansi* y *T. vivax*) (Peregrine 1994) de allí la importancia de su estudio y para establecer adecuados métodos integrados de control, toda vez que en los datos del VI Censo Agrícola de Venezuela (MAC 1998), se indica que la existencia de búfalos en el estado Guárico llega a unas 3417 cabezas, representando el 5,8% de la población nacional

La seroprevalencia relativa general promedio de la trypanosomosis por *T. vivax* en búfalos en dos fincas del Municipio Santa Rita de Manapire del estado Guárico, fue del 29,5% en las regiones nor-centro y sur del oriente, con diferencias significativas según la agroecología, ubicándose la mayor seroprevalencia en la unidad agroecológica (UA) E101 (85%) (Tamasaukas *et al.* 2006). Del 29,5% de la seroprevalencia relativa general obtenida en los búfalos, el 75% fue en hembras y el 25% en machos, y se distribuyó en un 75% en adultos y 25% en jóvenes. No evidenciándose diferencias estadísticas significativas entre los sexos y los grupos etarios ($P < 0,50$).

DIAGNÓSTICO DE LOS HEMOPARÁSITOS EN VENEZUELA

Métodos y/o técnicas de diagnóstico para *T. vivax*

Los medios más comunes para detectar infecciones por *T. vivax* incluyen entre otros, métodos serológicos y parasitológicos. Estos últimos confrontan como inconveniente principal la baja sensibilidad en la medida que la infección tiende a la cronicidad o la parasitemia se mantiene en bajos niveles (De Almeida *et al.* 1997).

En Venezuela, en el Guárico, estado de alta vocación y dedicación agrícola, la trypanosomosis ha sido estudiada por más de catorce años, encontrándose distribuida por todos los municipios, con seroprevalencia que varían de 33% a 50%, dependiendo de la zona agroecológica y época del año (Tamasaukas y Roa 1991-1992, Tamasaukas y González 1994, Tamasaukas 1992a, b; 1994; 1995a, b, c, Tamasaukas *et al.* 2002; Tamasaukas 2008). Una población mundial en vías de rápida urbanización exige a la agricultura una variedad mayor de atributos de calidad, no sólo en lo que respecta a los productos en sí, sino también a los métodos empleados para producirlos.

En el Perú sólo existe un reporte de trypanosomosis en el año 1977 que ocurrió en vacas Santa Gertrudis en Pucallpa, donde el agente causal fue el *Trypanosoma vivax* (Calderón y Bazalar 1978). Sin embargo, considerando que este parásito junto con otros hemoparásitos son los causantes del mayor número de bajas en el ganado bovino en zonas tropicales y subtropicales de América Central y del Sur (Quispe *et al.* 2003), se diseñó el presente estudio para evaluar la prevalencia de *Trypanosoma* sp. en bovinos aparentemente sanos de cuatro distritos (Callería, Campo Verde, Masisea y Yarina) de la provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali. Esta región está calificada como bosque húmedo tropical, con una temperatura media de 26 °C y una precipitación promedio anual de 2000 mm (Quispe *et al.* 2003). En este estudio, se halló una prevalencia de *Trypanosoma vivax* en 289 muestras de 22,2 ± 4,8% y 5,9 ± 2,7% mediante la técnica de Woo y frotis coloreado, respectivamente. La diferencia de animales positivos entre ambas pruebas se debe probablemente a la sensibilidad de las pruebas, toda vez que la sensibilidad del diagnóstico con frotis delgado es de 10% (Botero 1998), y con la técnica de Woo se ha demostrado que es superior al 60% (Desquesnes 1997).

La técnica de Woo se utilizó básicamente para determinar la prevalencia mientras que la técnica de frotis tuvo como principal objetivo identificar la especie de tripanosoma ya que permite una mejor visualización de la estructuras del parásito. (Quispe *et al.* 2003).

Los métodos serológicos como el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) parecieran ser los métodos que han proporcionado los mejores resultados. Sin embargo,

sus principales deficiencias son no poder discriminar entre infecciones recientes y pasadas y no diferenciar entre reacciones cruzadas con otros patógenos con los que *T. vivax* comparte similitud antigénica como *Trypanosoma evansi* y *T. theileri* (Desquesnes 1997, Morlais *et al.* 2001).

Recientemente, las técnicas de biología molecular, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido revelar infecciones en animales sintomáticos o asintomáticos sin parasitemia detectable (Dirie *et al.* 1993). Diferentes secuencias de ADN y ARN han sido diseñadas a partir de aislados africanos y americanos a fin de obtener mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico. Sin embargo, a pesar de ello, su uso en diagnósticos de campo ha sido limitado (Ventura *et al.* 2001).

En la actualidad, muchos investigadores utilizan la compatibilidad genética con *T. evansi* para justificar el uso de antígeno de este parásito en la elaboración de pruebas diagnósticas (por ejemplo, Ac-ELISA) para la detección de trypanosomosis por *T. vivax* (Uzcanga *et al.* 2002). Sin embargo, esto pudiera generar inconvenientes en zonas donde la trypanosomosis por *T. evansi* también sea endémica, y atribuir reacciones positivas observadas a la presencia de *T. evansi* en bovinos en ausencia de *T. vivax*, condición que fuera reportada por Toro *et al.* (1980).

En relación con la prevalencia de la trypanosomosis bovina por *T. vivax* en Venezuela, durante la última década se han venido detectando valores de 20,8% al 57,8% por exámenes serológicos e infecciones activas de 1% a 3,9% por exámenes parasitológicos directos (Toro 1990, Perrone *et al.* 1991, Tamasaukas *et al.* 2006).

Se ha registrado la detección de infecciones subclínicas o asintomáticas producidas por *T. vivax* en bovinos de fincas ganaderas del estado Mérida localizadas entre el pie de monte andino y la depresión de la cuenca del Lago de Maracaibo, área escogida por su jerarquía de zona ganadera (Bolívar *et al.* 2006). Para ello fueron utilizados tres métodos diagnósticos: 1) Diagnóstico parasitológico directo mediante el empleo de microcapilar, examen al fresco y frotis sanguíneo coloreado. 2) PCR como herramienta de la biología molecular, empleando los oligonucleótidos especie-específicos-TviSL1 y TviSL2- de secuencias 5' G C T C T C C A A T C T T A A C C C T A 3' y 5' G T T C C A G G C G T G C A A A C G T C 3', respectivamente, siguiendo la metodología descrita por Ventura *et al.*

(2001). 3) Western blot con proteínas citosólicas de las formas sanguíneas de *T. vivax* (Bolívar *et al.* 2006, en preparación). Las pruebas parasitológicas revelaron infecciones activas en un 2,8%. La detección de parásitos circulantes por las técnicas de examen al fresco y frotis sanguíneo coloreado fueron reconocidos morfológicamente de acuerdo a los criterios de Hoare (1972).

Las infecciones subclínicas o asintomáticas detectadas por métodos parasitológicos fueron corroboradas por PCR en muestra de sangre de ambos animales. En este caso el producto de amplificación de PCR, reveló una banda de 210 pares de bases correspondiente al fragmento amplificado de la región intergénica del gen SL de *T. vivax*. Similarmente, la detección de infección subclínica por *T. vivax* en bovinos fue también confirmada con la utilización de una fracción proteica de membrana del parásito, la cual fue utilizada como antígeno en una reacción de Western blot donde el anticuerpo primario fue el suero de animales expuestos a la infección (Bolívar *et al.* 2006). En este caso se obtuvo en uno de los dos animales positivos una banda de aproximadamente 54 kDa. Quizás la razón de no detectar la misma señal en el otro animal positivo, podría deberse a una infección reciente en la que los niveles de IgG a la cual se asocia el método usado hayan estado muy bajos en el animal infectado. Durante esta prueba fue comprobada la especificidad de la reacción para *T. vivax*, utilizando suero de animales con infecciones causadas por *Anaplasma marginale*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium paratuberculosis* y *T. evansi* los cuales fueron negativos.

Métodos y/o técnicas de diagnóstico para *A. marginale*

La identificación microscópica de *A. marginale* en extendidos sanguíneos requiere más de 10 millones de parásitos por ml de sangre; concentraciones inferiores ameritan técnicas con mayor sensibilidad como las de biología molecular (Kieser *et al.* 1990).

La detección de *A. marginale* puede realizarse en el laboratorio, mediante la revisión de frotis sanguíneos utilizando diferentes colorantes comerciales, tales como Diff Quick Stain, Giemsa y Acridina Naranja, donde se puede observar un cuerpo denso en la periferia de los glóbulos rojos (Díaz *et al.* 2003). Esta técnica permite diagnosticar principalmente los animales en fase aguda. En el estado de portador es

difícil la observación de los organismos en un frotis sanguíneo, por lo que se hace necesario el empleo de técnicas más precisas y sensibles, tales como Fijación del Complemento, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), entre otras. Esta última es una de las pruebas más utilizada, por ser económica, sencilla, sistemática y además por tener una alta sensibilidad y especificidad.

Existen antígenos marcadores capaces de definir el curso de la infección con *A. marginale*, tanto durante la fase temprana (aguda) como la tardía de recuperación (convalecencia) de la infección (Giardina *et al.* 2007). Cinco becerros, mestizos, parasitológicamente negativos a *A. marginale*, fueron esplenectomizados y experimentalmente infectados con un aislado Zulia de *A. marginale*. Los sueros colectados fueron usados para los ensayos de Inmunotransferencia y el análisis de las frecuencias de reconocimiento por inmunoblot. El reconocimiento de cada molécula mostró que hay antígenos que reaccionaron con sueros normales o prepatente, es decir, los antígenos de reacción cruzada no específica. Los antígenos marcadores específicos son la banda 63 (proteína p65 kDa) para la fase aguda y las bandas 188; 68 (p70 kDa) y 58 (p60 kDa) para la fase convaleciente. Los resultados obtenidos demuestran también que la banda 18 (p19 kDa o MSP5) es un marcador específico de infección con *Anaplasma*.

El ensayo inmunoenzimático ELISA se presenta como una alternativa para el serodiagnóstico (Elezalide y Tavares 2006). En este sentido, así como en otros ensayos serodiagnósticos, puede utilizarse un antígeno crudo, es decir, aquel que contiene una mezcla de los componentes del organismo a detectar, o un antígeno con grados de purificación diversos, que finalmente dependerán de la sensibilidad y especificidad que se desea conferir al ensayo. Así como existe una gran variedad en cuanto al antígeno a utilizar, también la hay en relación a los conjugados, de lo cual se derivan los diversos tipos de ELISA que existen actualmente, siendo los más utilizados (Pance y Giardina 1990, Abbas *et al.* 2002): ELISA directo, ELISA indirecto y ELISA sándwich.

El desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de esta hemoparasitosis incentivó a los investigadores a la identificación y caracterización de antígenos de *A. marginale*, por clonación de genes y producción de proteínas recombinantes para ser usadas como antígenos en los diferentes ensayos serológicos.

Se ha desarrollado un ELISA competitivo utilizando el anticuerpo monoclonal que reconoce la MSP5 y la MSP5 recombinante (MSP5r) (Knowles *et al.* 1996), demostrando que el ELISA utilizando MSP5r es altamente específico para el diagnóstico serológico de la anaplasmosis en el ganado de los Estados Unidos y que este ensayo es capaz de detectar animales con infecciones tempranas o con un largo tiempo de infección. Finalmente Reyna-Bello *et al.* (1998) evaluaron la proteína de superficie MSP5r como antígeno para desarrollar un ELISA indirecto para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina en Venezuela, encontrando una prevalencia superior al 50%.

La MSP5 es una proteína que tiene epítopes reconocidos por los anticuerpos de la mayoría de los bovinos infectados con *A. marginale* o *A. centrale*. Esto es demostrado por Molloy *et al.* (1999) quien realizando un estudio comparativo del ELISA competitivo y la tarjeta de aglutinación, detectó anticuerpos tanto de *A. marginale* como de *A. ovis* utilizando la MSP5 recombinante. Incluso sueros de ovinos y caprinos con *A. ovis*, también reconocen esta proteína. Por esto la MSP5, puede ser considerada como herramienta para el diagnóstico de la anaplasmosis (Palmer y McElwain 1995, Reyna-Bello *et al.* 1998).

En la especie bufalina, se refiere por ELISA un 37,33% de seropositividad (Bethencourt *et al.* 2005). Por su parte, en ovinos venezolanos se encontró que el 53,1% de animales están infectados con *Anaplasma* sp (Tavares *et al.* 2004).

El método usado para la cuantificación de parásitos, es una adaptación del método original de Brener (1962). Se colocan 5 µl de sangre en un cubreobjetos y sobre la sangre una laminilla cubreobjetos (22 mm x 22 mm) que se presiona suavemente para permitir que la muestra se distribuya homogéneamente bajo la superficie del cubreobjetos. Luego en el microscopio son observados 100 campos a 40X para determinar la cantidad de organismos presentes (Oc). (González 2006).

La fórmula que permite la evaluación de la parasitemia es la siguiente:

$$\text{Organismos / ml} = \text{Oc} \times \text{Fm} \times \text{Fd}$$

Donde Oc representa el número de organismos contados, Fm es el factor óptico del microscopio y Fd es el factor de dilución de la muestra. Fm es un valor

constante que, por depender de las propiedades de fabricación de la óptica del instrumento utilizado, es diferente para cada microscopio. Para calcularlo, las magnitudes correspondientes a las áreas del cubreobjetos y de un campo microscópico (400X) se dividen. Considerando que el método original fue diseñado para 5mm³ y que en este caso se utilizarán 5µl, el valor proveniente del cociente de las áreas se divide entre 0,05 y para que el resultado final se exprese en ml, el cociente obtenido se divide entre 10.

CONTROL DE LAS HEMOPARASITOSIS EN VENEZUELA

Varios autores venezolanos (Alfaro *et al.* 1994a, b) concluyen que las condiciones edafoclimáticas y la alta proliferación de posibles vectores (especies del género *Tabanus* y *Stomoxys*) ejercen marcado efecto en la transmisión de la enfermedad hemoparasitaria, tanto en la anaplasmosis como en la trypanosomosis, por lo que las condiciones ambientales y la presencia de vectores deben ser consideradas para establecer planes estratégicos de control, al igual que lo expusieron Tamasaukas y Roa (1991-1992). Existe una alta ocurrencia y amplia distribución de garrapatas, vectores biológicos de estos parásitos, de la especie *Boophilus microplus*, en todo el estado Guárico (Toro 1990).

Sobre la relación *Babesia* spp - *Boophilus microplus*, Meléndez (1998) señaló valores de incidencia de esporoquinetos de *Babesia* spp. en frotis de hemolinfa de telegoninas (coloreados con Giemsa) de *Boophilus microplus* de 20,1% en una finca y de 6,5% en la segunda explotación evaluada en la época seca en el Municipio Torres del estado Lara, mientras que en la época lluviosa la incidencia fue mucho menor: 3,43% y 0,32%, respectivamente, a pesar de no haber correlación entre las dos épocas.

En Venezuela, Power y Moissant de Román (1991-1992) refieren una alta incidencia de garrapatas en el estado Guárico, en especial de *Boophilus microplus* (99,8%), arácnido involucrado directamente en la transmisión de la babesiosis bovina y también de la anaplasmosis y en menor grado en la de la trypanosomosis, lo cual sugiere que, debido a una alta ocurrencia de garrapatas en las fincas evaluadas en el presente estudio, los animales estarían más predispuestos a brotes agudos de estas hemoparasitosis

y a la influencia de las condiciones agroecológicas y climáticas de las explotaciones, ya que confirmaron el hecho de que *Boophilus microplus* predomina en áreas de pastizales bajos, tipo alfombra, con poco o ningún tipo de arbustos o árboles, tal como se observó en ambas fincas estudiadas en el trabajo de Tamasaukas *et al.* (2000a).

Los tabánidos (Diptera: Tabanidae) son considerados vectores mecánicos de más de 35 agentes patógenos que causan enfermedades en los animales (Foil 1989). Dentro de éstas, la trypanosomosis ha sido señalada como una de las causantes de pérdidas económicas en la ganadería bovina encontrándose esta enfermedad ampliamente distribuida en el país (Tamasaukas 1992a, b). A pesar de la importancia de los tabánidos como transmisores de esta enfermedad, poco se conoce sobre la ecología de Tabanidae en Venezuela y esto se ve reflejado por las escasas publicaciones referidas a la familia.

Considerando que la probabilidad de transmisión de agentes patógenos es influenciada por la abundancia de los vectores, es evidente la necesidad de realizar estudios sobre el comportamiento de las poblaciones de tabánidos durante los diferentes períodos del año, para establecer que época podría ser la más importante en una región en términos de riesgo de transmisión mecánica por estos insectos. Por ello, se ha estudiado la estacionalidad y abundancia relativa de las especies de la familia Tabanidae capturadas en el sector Las Lajas, municipio Miranda del estado Guárico (Velásquez de Ríos *et al.* 2004), reportaron que, de las 14 especies colectadas en el presente estudio, dos tuvieron abundancia relativa alta, representando el 74,75 % del total de captura, de modo que los picos poblacionales observados representan *T. claripennis* y *T. pungens*. En otros trabajos conducidos en la región de Pantanal, Brasil *T. claripennis* resultó estar dentro de las especies más abundantes. Sin embargo, *T. pungens* mostró una abundancia relativa baja (Barros 2001, Barros y Foil 1999). Probablemente las condiciones donde fue realizado el presente estudio son más favorables para el desarrollo de *T. pungens* que en el Pantanal, Brasil, o que en este último no corresponda con su centro de abundancia.

Los picos poblacionales de tabánidos observados a finales del período lluvioso indican de modo general, que esta época podría ser la más importante en esta localidad en términos de riesgo de transmisión mecánica, donde las especies *T. pungens* y *T. claripennis*,

por ser las más abundantes, podrían probablemente estar involucradas en esta transmisión. En general, la alta frecuencia de captura de tabánidos a finales del período lluvioso así como la baja frecuencia de captura en la época seca podría explicar la variación temporal de la seroprevalencia de *T. vivax* en el estado Guárico (Tamasaukas y Roa 1991-1992).

En Venezuela, el *A. marginale* es transmitido principalmente por garrapatas y otros insectos hematófagos, como moscas tabánidas (Díaz *et al.* 2003). Se ha señalado que unas 20 especies de garrapatas podrían estar involucradas en la transmisión de este organismo rickettsial. Sin embargo es conveniente indicar que *Boophilus microplus* es garrapata de un solo hospedador por lo que el papel de la misma en la transmisión de la anaplasmosis bovina, tiene fuertes evidencias en contra, teniendo menor importancia de la que tradicionalmente se le atribuyó.

La transmisión también puede darse por transfusiones sanguíneas con sangre infectada por el uso de instrumentos quirúrgicos y agujas hipodérmicas contaminadas, y en algunos casos ha sido reportada la transmisión transplacentaria en el tercer trimestre de gestación (Meléndez *et al.* 1993).

Los bovinos jóvenes son considerados más resistentes a los efectos de una primoinfección por *A. marginale*, disminuyendo en estos casos los cuadros clínicos de la enfermedad y desarrollando una larga inmunidad; sin embargo, se ha reportado que la anaplasmosis podría causar problemas graves en terneros de ciertas regiones en América del Sur.

Todas las razas de bovinos son susceptibles; sin embargo, el *Bos indicus* sufre en forma más leve la infección que el *Bos taurus*. Estudios realizados en rebaños con anaplasmosis, permiten describir dos situaciones epidemiológicas distintas.

En primer lugar, una condición de estabilidad enzoótica donde una gran parte del rebaño desarrolla inmunidad al agente etiológico sin presentar enfermedad clínica, debido a que más del 75% de los becerros son expuestos a una carga suficiente del microorganismo antes de los nueve meses de edad conduciendo al desarrollo de preinmunidad y seroconversión, garantizando así un bajo riesgo de enfermedad clínica durante la edad adulta.

En segundo lugar, puede ocurrir una condición de inestabilidad enzoótica cuando un número variable de animales (10-75%) llega a los nueve meses de edad

sin desarrollar premunición ni seroconversión, como consecuencia de una baja exposición al agente; esta situación puede aumentar significativamente el riesgo de la enfermedad en el rebaño. Por otra parte, en fincas donde menos del 10% de los becerros son expuestos al microorganismo antes de los nueve meses de edad, estos rebaños se convierten en susceptibles, pero con bajo riesgo a la enfermedad, debido a que la tasa de inoculación es insuficiente para infectar a los animales en su vida posterior.

Anaplasmosis

Según el estudio de Montenegro-James *et al.* (1990), los métodos inmunoprofilácticos usados para la vacunación contra la anaplasmosis bovina incluyen:

a) Premunición con *A. marginale* o *A. centrale* (especie menos virulenta). Con este método se puede presentar la enfermedad clínica y ocasionalmente mortalidad a consecuencia del inóculo premunizante. Además, la premunición establece un estado de portador perpetuando el organismo en el ambiente.

b) Vacunación con una preparación inactivada de *A. marginale* (Anaplaz®, Fort Dodge Laboratories, Fort Dodge, Iowa, EUA), vacuna que contiene restos de estroma eritrocitario y puede inducir isoeritrolisis en becerros que reciben calostro de madres vacunadas.

c) Uso de una cepa atenuada desarrollada por Ristic (1971) la cual ha sido aplicada en varios países latinoamericanos donde su utilización ha proporcionado una adaptación eficaz de ganado joven a los trópicos. Sin embargo, puede causar severos cuadros clínicos o muerte en toros y vacas preñadas o en lactación, siendo además su manejo poco práctico, por cuanto debe mantenerse en nitrógeno líquido para preservar la viabilidad del inóculo vacunal.

Se ha reportado una contribución directa y efectiva en la salud de los venezolanos en el aporte de proteína animal en su dieta diaria al disminuir la morbo-mortalidad de la ganadería (ANACENT 2007). La aplicabilidad de esa tecnología es un valor agregado en incrementar la eficiencia y productividad en los ganaderos venezolanos. Utilizando para ello la distribución de la vacuna contra la anaplasmosis bovina de marca comercial Premacent®, la cual es el primer y único inmunógeno hecho en Venezuela para la prevención de esta enfermedad hemotrópica.

En la respuesta humoral a la vacunación con inmunógeno producido con *A. centrale* en vacas Jersey preñadas, vacunadas, los anticuerpos anti-Anaplasma fueron detectados al día 14 post-vacunación con un título promedio de 360 (en un rango de 80 – 640) (Meléndez *et al.* 2003). Además, todas las vacas vacunadas mostraron pocos cambios en los valores hemáticos o en la temperatura corporal, y todas parieron becerros saludables, por lo que concluyen que la vacunación de vacas adultas gestantes, con este inmunógeno de *A. centrale* es segura y puede resultar en una inmunidad cruzada contra *A. marginale*.

Babesiosis

En Venezuela, se evaluó la capacidad de protección homóloga y heteróloga de un exoantígeno de *B. bovis*, cepa venezolana, obtenido mediante cultivo *in vitro* en bovinos susceptibles, mestizos Holstein, de 18 meses de edad, que fueron inoculados con exoantígeno de *B. bovis* y desafiados con cepas de *B. bovis* de Venezuela, Ecuador, Argentina, Colombia y México. El exoantígeno se administró por vía sub-cutánea, en dos dosis con intervalo de tres semanas y la protección se midió sobre la base de la determinación de los siguientes parámetros fisiopatológicos: período pre-patente, nivel y duración de parasitemia, duración del estado febril, disminución del hematocrito, presencia de criofibrinógeno plasmático, niveles de anticuerpos homólogos y heterólogos séricos específicos y ganancia neta de peso corporal, post-desafío. Hubo un buen grado de protección frente al desafío con las cepas de Venezuela (homóloga), Ecuador (heteróloga) y Argentina (heteróloga); sin embargo, la protección heteróloga fue deficiente frente a las cepas de Colombia y México. Se concluye que el uso de exoantígenos de cultivo como método inmunoprofiláctico constituye una técnica inocua y sencilla para la protección de los bovinos contra la babesiosis (Toro *et al.* 1988).

Trypanosomosis

Los moderados a altos niveles de infección que se encuentran en Venezuela, puede atribuirse a la existencia de condiciones que favorecen la presencia y difusión de esta parasitemia, tales como la pobre condición corporal de la mayoría de los animales muestreados, el tipo de manejo sanitario deficiente, donde

por ejemplo se emplea una misma aguja en diferentes animales, y por último, la imposibilidad de controlar a los insectos hematófagos, principales transmisores de la enfermedad.

Ante la carencia de una vacuna y las desventajas que presentan los métodos de control hasta ahora conocidos, los estudiosos del tema buscan el control de la enfermedad, basados en tres aspectos: integración con el desarrollo rural, integración con las medidas de control de otras enfermedades (brucelosis, leptospirosis, rabia, etc.) y la integración de varias medidas de control del vector y la trypanosomosis.

La trypanosomosis ha sido catalogada como la tercera enfermedad de importancia económica en Colombia (Camus *et al.* 1990); en Brasil, se han estimado pérdidas económicas por brotes agudos en la región del Pantanal (Desquesnes 1997). Señalando Murphy y Pellé (1997) que, cerca de 44 millones de cabezas de ganado bovino (30% del ganado que existe en el continente africano) y un número similar de ovinos y caprinos, corren el riesgo de infectarse con trypanosomas. En tanto que, Dávila las estimaron el riesgo de las pérdidas en producción de carne y leche, y en fuerza de tracción, además del costo de los programas de control de la enfermedad, en unos 500 millones de dólares anuales, debiendo sumarse las pérdidas indirectas, por la disminución del potencial de producción agropecuaria, que aumentan la cifra a 5 mil millones de dólares cada año (Murphy y Pellé 1997).

El diagnóstico certero y oportuno es clave para la instauración de medidas profilácticas y contener el avance de la enfermedad.

La especificidad de las técnicas de ELISA se refuerza en gran medida por la calidad de los antígenos y reactivos que se utilicen para su realización. Para la Ac-ELISA, es uno de los requerimientos críticos la observancia del procedimiento de identificación y selección del antígeno (*T. vivax*) a usar en la sensibilización de la placa; para ello, una herramienta biotecnológica que blinda la producción de estos antígenos, es la técnica de PCR (Polimerasa Chain Reaction).

La producción de anticuerpos monoclonales (Ac-mono), aumenta la especificidad de la técnica de Ac-ELISA, así como la de los valores predictivos, toda vez que se utiliza un antígeno purificado de *T. vivax*.

Gran parte de las razas del rebaño bovino del Oeste del África, tales como la N'Dama y Shorthorns del oeste africano son resistentes a la trypanosomosis

transmitidas por la mosca tsé-tsé. El término de trypanotolerancia viene dado porque los animales son capaces de mantener los valores del hematocrito y controlar la tasa de crecimiento de la consecuente infección, por lo que considerados los indicadores de esta condición, genética y hereditaria (Van Der Waaij *et al.* 2003).

La heredabilidad de este carácter de trypanotolerancia ha sido bien estudiada en el continente africano, estableciéndose métodos para la caracterización fenotípica (determinación del hematocrito, valores hemáticos, transferrinas, grupo sanguíneo, entre otros).

La gran variabilidad observada en animales utilizados para los sistemas de producción doble propósito en el llano de Venezuela, conlleva a plantearse la interrogante sobre cuál tipo animal sería el más apropiado para las condiciones agroclimáticas particulares de cada región, sobre todo considerando los segmentos de la población involucrados, que generalmente corresponde a pequeños productores, sin posibilidades de hacer grandes inversiones en sus unidades de producción ni de trabajar con animales de alta producción, los cuales son muy exigentes en el uso de insumos costosos.

Una selección genética para los sistemas de producción a pastoreo, obliga a plantearse que dichos sistemas tienen beneficios adicionales que los eximen de la necesidad de alcanzar la máxima expresión del potencial genético animal, y que dicha expresión deberá estar dentro de las restricciones que el sistema les impone (clima, nutrición, manejo, sanidad, entre otros) (Molinuevo 1997).

Los objetivos de un programa de selección deben dirigirse a mantener el equilibrio entre los caracteres de importancia económica actual y el ajuste de la población con el medio. Para restablecer el equilibrio se hace preciso mejorar el suministro de alimento, en el corto plazo, y en el mediano, recurrir a un potencial genético que pueda ser totalmente cubierto con el nivel alimentario y sanitario que caracteriza el sistema (Molinuevo 1998).

Una estrategia de control de la trypanosomosis que consiste en seleccionar los bovinos por su tolerancia a los desafíos por *T. vivax*, cualidad estudiada ampliamente en el continente africano por diversos métodos de observación, tipificación por valores hematológicos, modulación a la infección, estudios de genética molecular, etc., es de importancia,

pues aunque no elimina la transmisión del parásito, disminuye considerablemente la prevalencia del mismo en zonas endémicas, lo cual es muy deseable vista las implicaciones económicas de esta hemoparasitosis sobre la producción y productividad de los rebaños y el bajo costo de implementar esta estrategia biotecnológica (McDermott y Coleman 2001).

La mayor frecuencia de animales positivos a *Trypanosoma vivax* se encuentra en animales de razas importadas, principalmente Holstein, Pardo Suizo, y otras de razas índicas. Esto puede atribuirse a que son animales altamente susceptibles y a la pérdida por los cruces, de la condición de trypanotolerancia como ha sido evidenciado en los países africanos.

En los Llanos Centrales de Venezuela, se identificó y caracterizó a bovinos trypanotolerantes (TT) y trypanosusceptibles (TS) a *T. vivax* con base en marcadores fenotípicos: clínicos, parasitológicos, hematológicos, serológico e inmunológico y su asociación con el tamaño de los animales. En 790 bovinos (hembras de dos ó mas partos y machos), bajo un diseño estratificado aleatorizado, en 20 rebaños en los estados Apure, Barinas, Cojedes y Guárico. Se identificaron 85,57% de TT y 14,3% de TS; 45,91 % fueron TT y 7,14% TS en pequeños y medianos y 11,2 % de TT y 2,04% de TS en grandes. Se identificaron tres tipos de animales: pequeños (41,58%), medianos (26,67%) y grandes (29,75%). (Agudo *et al.* 2009).

Con prevalencia de *T. vivax* de 0,83% en Apure, 8,47% en Aragua, 16,66% en Barinas, 17,5% en Cojedes y 24,03% en Guárico, con diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$). Con seroprevalencia de 85,76% por Ac-ELISA y 62,61% de positividad a complejos inmunes. Hematocrito promedio de 31,48% asociado significativamente con el color de la conjuntiva ($P < 0,05$). El 35,82% con valores menores o iguales a 10 g/dl de hemoglobina. Sin asociación significativa entre prevalencia de *T. vivax* y valores aceptables de hematocrito.

BIOTECNOLOGÍAS APLICABLES AL CONTROL DE LAS HEMOPARASITOSIS

Existe alta variabilidad antigénica del *T. vivax* que conlleva de la misma manera a diferencias en la patogenicidad de las cepas, por lo que resulta necesario el desarrollo de estuches diagnósticos para uso local que demuestren consistencia en los resultados e ir

a la par de la caracterización molecular del parásito a fin de establecer los patrones filogenéticos de las cepas originarias y sus poblaciones, para así realizar un seguimiento epidemiológico consistente de la enfermedad a nivel local y mundial (Desquesnes 1997).

Las estrategias, pueden ofrecer un futuro muy promisorio en términos mediatos, es el desarrollo de los estuches de ELISA (Ag-ELISA y Ac-ELISA) y su imbricación con la PCR para la obtención de los antígenos puros de calidad de *T. vivax*.

Los estudios, aunque bien orientados por la evidencia previa de reacciones cruzadas entre *T. vivax* y *T. evansi*, no han logrado el cometido de obtener resultados satisfactorios por la pérdida en la especificidad y en la confiabilidad de los valores predictivos de la ELISA, al usar al *T. evansi* como fuente de Ag para el diagnóstico del *T. vivax* en rebaños bovinos. Por ello, con la caracterización biomolecular de las cepas de *T. vivax*, por ejemplo, con la PCR y la determinación de la variabilidad patogénica en ellas, se avanzaría a pasos agigantados pues podrían establecerse los árboles filogenéticos del *T. vivax* (Reifenberg *et al.*, 1997) y derivar los estuches de diagnóstico con las diversas cepas actuantes en el ambiente, regionalizadas y bien definidas, pues la adopción de métodos de estandarización y de control estadístico de los procesos, contribuyen a la generación de productos de calidad y estabilidad para su uso masivo.

Los trabajos llevados a cabo sobre la diferenciación genética de los trypanosomas durante su ciclo de vida, en general orientan hacia la diversidad de procesos biológicos que se llevan a cabo durante este fenómeno, tales como ciclos de división celular, diferenciación y desarrollo, los cuales son manejados por cambios en la expresión genética de los parásitos.

Para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el control de la proliferación y diferenciación de los trypanosomas, Murphy y Pellé (1997) reportan el uso de una técnica de PCR de expresión diferencial, la de amplificación de secuencias expresadas diferencial y aleatoriamente (RADES: randomly amplified differentially expressed sequences) para la identificación rápida de genes de trypanosomas y de leishmanias. Este método es eficaz para utilizar muestras contaminadas con materiales del hospedador, siendo aplicable a todos los quinetoplastídeos, y especialmente útil para el estudio de formas intra- como extracelulares, en los cuales los procedimientos de purificación son tan extensos que alteran la expresión genética.

Se ha logrado evidenciar que, los parásitos responden a señales del hospedador para controlar su crecimiento y proliferación, y a las cuales el parásito responde con otras señales para establecer y mantener la infección y causar la enfermedad. De allí que, las formas infectivas (en especies de trypanosomas africanos con fases de su ciclo de vida en vectores biológicos), metacíclicas, pero no en división, al pasar al hospedador, entran rápidamente a diferenciarse hacia las formas sanguíneas en división, en respuesta al cambio de temperatura y otras señales del hospedador.

Las señales emanadas de los parásitos infectantes previenen que el hospedador desencadene una respuesta inmune efectiva para evitar el establecimiento de la infección, y así, una vez instaurada la infección, estas formas en división activas, pasan a diferenciarse a formas no en división, por ello, los parásitos, aunque el hospedador pueda controlar en cierto grado el crecimiento y proliferación de los parásitos, en muchos casos no logran controlar o eliminar la infección.

Por otra parte, estudios biomoleculares de especies de trypanosomas africanos, sugieren que los genes de los parásitos codifican para productos potencialmente moduladores del sistema inmune de sus hospedadores mamíferos, para secretar moléculas capaces de mimetizar (interferir) las citoquinas del hospedador. Al ser seleccionados por trypanotolerancia, se avanza en el control de una enfermedad que en los llanos venezolanos es la principal limitante sanitaria, teniendo prevalencia de hasta un 50% en época de lluvias. Este carácter se expresa tanto en el macho como en la hembra, por lo tanto el estudio de los marcadores puede realizarse en ambos sexos. De esta manera, se disminuye la necesidad de estar aplicando tratamientos con drogas trypanocidas, pues son altamente tóxicas y costosas, produciendo un animal que en condiciones normales puede controlar tanto la parasitemia como la anemia, sin la introducción de drogas, cuyos productos (leche y carne) serán de calidad, al estar libres de drogas, reduciendo el riesgo en salud pública por presencia de residuos de éstas en los productos y sub-productos.

Los métodos de caracterización genética para trypanotolerancia sirven para establecer un programa de selección y mejoramiento animal, sin tener que utilizar las conocidas pruebas de progenie que requieren sofisticada tecnología y décadas para generar productos tangibles.

Entre los avances en la investigación para el diagnóstico y control de la trypanosomosis, están la

evaluación de los estuches de ELISA (Ac-ELISA y Ag-ELISA) para el diagnóstico de la trypanosomosis bovina en tres regiones del llano venezolano (Llanos Centrales, Orientales y Occidentales) y la evaluación de estrategias biotecnológicas de genética molecular, como los marcadores moleculares para la identificación de QTL's en la determinación de la trypanotolerancia en animales DP para su inclusión como hembras y machos mejoradores del rebaño doble propósito en los llanos centrales, estudios derivados de la caracterización de los marcadores fenotípicos (hemáticos, clínicos, parasitológicos, bioquímicos, inmunoserológicos e identificación de tipo animal por caracteres zoométricos).

LITERATURA CITADA

- Abbas, A; Andrew, L; Pober, J. 2002. Inmunología celular y molecular. Editado por Mcgrawhill Interamericana. 4 ed. España. 577 p.
- Agudo, L; Tamasaukas, R; Silva, A; Sánchez, J; Ron, J; Fernández, M; Florio, F; Vintimilla, M; Colmenares, O; Rivera, S. 2009. Tipo bovino trypanotolerante y trypanosusceptible doble propósito en la región de los llanos Centrales de Venezuela. Identificación y caracterización fenotípica (en línea). Consultado 30 oct. 2009. Disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009.html>
- Alfaro, C; García, F; Toro, M; Valle, A; Coa, P. 1994a. Distribución de la anaplasmosis bovina en diferentes zonas del estado Monagas. *In* Memorias, VIII Congreso Venezolano de Zootecnia. San Juan de Los Morros, Venezuela. sp.
- Alfaro, C; García, F; Toro, M; Valle, A. 1994b. Prevalencia de anaplasmosis bovina de acuerdo a factores intrínsecos del hospedador en bovinos del estado Monagas. *In* Memorias VIII Congreso Venezolano de Zootecnia. San Juan de Los Morros, Venezuela. sp.
- ANACENT. 2007. Anacent. (en línea). Consultado 7 oct. 2007. Disponible en <http://www.cimbuc.fcs.uc.edu.ve/anacent.htm>.
- Barros T; Foil L. 1999. Seasonal occurrence and relative abundance of Tabanidae (Diptera) from the Pantanal Region, Brasil. *Mem. Entomol. Internat.* 14:387-396.
- Barros T. 2001. Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*. 96(7):917-923.

- Bethencourt, A; Eleizalde, M; Pérez, G; García, H; Reyna-Bello, A. 2005. Ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de tripanosomosis en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*). In Memorias LV Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC). Caracas, Venezuela. sp.
- Bolívar, AM; García-Lugo, P; Crisante, G; Rojas, A; Teixeira, M; Añez, N. 2006. Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. Boletín de Malariología y Salud Ambiental 46(1):87-90.
- Botero, D. Parasitosis humanas. 1998. 3 ed. Editorial Rojo. Colombia. p. 203-432.
- Brener, Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 4:389-396.
- Calderón G; Bazalar, H. 1978. Presencia de *Trypanosoma vivax* en ganado vacuno de Pucallpa. Bol. Soc. Per. Parasitol. Lima. p. 1-5.
- Cammilli, A; Reyna-Bello, A; Caballero, H. 2001. Respuesta inmune contra la msp-5 en bovinos durante una infección experimental y en animales crónicamente infectados con *Anaplasma marginale*. In Memorias, LI Convención Anual, Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia. (ASOVAC). San Cristóbal, Estado Táchira, Venezuela. sp.
- Camus E; Martrenchar A. 1990. Infection expérimentale de zebus guyanais avec *Trypanosoma vivax*. Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop. 43:467-472.
- Carrique, JJ; Widdowson, AM; Cuellar, AM; Ribera, H; Walker, AR. 2000. Risk of babesiosis and anaplasmosis in different ecological zones of Santa Cruz Department, Bolivia. Vet. Parasitol. 93:29-38.
- De Almeida, PJP; Ndao, M; Van Meirvenne, N; Geerts, S. 1997. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. Acta Trópica 66(1):45-50.
- De Bernardi, L. 2004. Búfalos: análisis de la cadena alimentaria (en línea). Dirección de Industria Alimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos. Dirección Nacional de Alimentos. Ministerio de Economía - Buenos Aires, República Argentina. Consultado 22 nov. 2008. Disponible en <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/carnes/Bufalos/Bufalos.htm>.
- Desquesnes, M. 1997. Evaluation of simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immunosorbent assay. Acta Trop. 65:139-148.
- Díaz, D; Valera, Z; Andrade, E; de, Parra, O; Escalona, F; Ramírez, R. 2003. Prevalencia de *Anaplasma marginale* en Bovinos del Sector La Piñata, Municipio La Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia 13(3):193-198.
- Dirie, MF; Otte, MJ; Hatthi, T; Gardiner, PR. 1993. Comparative studies of *Trypanosoma vivax* isolates from Colombia. Parasitology 106(1):21-29.
- Duno, F. 1992. Prevalencia de la tripanosomiasis bovina en la región nororiental del estado Falcón. Tesis Mag. Sci. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 135 p.
- Eleizalde, M; Tavares, L. 2006. ELISA para el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. Curso "Aplicación de la Biotecnología como herramienta de trabajo en la Investigación", Subproyecto de Biotecnología BID FONACIT IVIC Red de Identificación y Diagnóstico Molecular de Hemoparásitos con Impacto Económico en el Sector Agropecuario" (RIDMH)" (en línea). Consultado 3 sept. 2008. Disponible en <http://www.reddehemoparasitos.org/cursos/biotecnologia/elisa.pdf>.
- Foil, LD. 1989. Tabanids as vectors of disease agents. Parasitol. Today. 5(3):88-96.
- Giardina, S; Hartt, Y; Pance, A. 2007. Analysis of the immune response of infected bovines with *Anaplasma marginale*. Identification of infection stage marker antigens. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia 17(1):7-14.
- González, R. 2006. Técnicas directas para el diagnóstico de hemoparásitos. In Manual de Laboratorio. I Curso teórico - práctico técnicas de diagnóstico aplicadas a hemoparásitos de interés veterinario. UNERG, Zaraza, Estado Guárico (en línea). Consultado 3 sept. 2008. Disponible en <http://www.reddehemoparasitos.org/cursos/zaraza/manuallaboratorio.pdf>.
- Guglielmone, AA. 1992. Epizootiología de las enfermedades hemoparasitarias de los vacunos. Revista Cubana de Ciencias Veterinarias. 24(2-3):73-107.
- Hoare, C. 1972. The trypanosomes of mammals. Blackwell Scientific Publications. 750 p.
- Kieser, S; Eriks, I; Palmer, G; Cyclic. 1990. Rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. Infect. Immun. 58:1117-1119.
- Knowles, D; Torioni de Echaide, S; Palmer, G; McGuire, T; Stiller, D; McElwain, T. 1996. Antibody against *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and

- erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 34(9):2225-2230.
- MAC (Ministerio de Agricultura y Cría). 1998. VI Censo Agrícola: Resultados preliminares. Dirección de Estadística e Informática (ed), años 1995-1997 (en línea). Consultado 7 oct. 2008. Disponible en <http://www.zulia.infoagro.info.ve/INFORMACION%20AGROPECUARIA/PRODUCCION/Censo.htm>.
- Mcdermott, JJ; Coleman, PG. 2001. Comparing apples and oranges-model-based assessment of different Tsetse-transmitted trypanosomosis control strategies. *Intern. J. Parasitol.* 31(5-6):603-609.
- Meléndez, R. 1998. Revisión integral de los factores epidemiológicos que inciden en la relación *Boophilus microplus*-Bovino-*Babesia* spp. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia* 8(1):25-34.
- Meléndez, RD; Forlano, M; Figueroa, W. 1993. Perinatal infection with *Trypanosoma vivax* in a calf in Venezuela. *J. Parasitol.* 79(2):293-294.
- Meléndez, R; Toro, M; Niccitta, G; Moreno, J; Puzzar, S; Morales, J. 2003. Humoral immune response and hematologic evaluation of pregnant Jersey cows after vaccination with *Anaplasma centrale*. *Veterinary Microbiology* 94(4):335-339.
- Molinuevo, HA. 1997. Individual performance and production per unit area of grazing steers of different potential growth rates. *Animal Sciences* 65:373-381.
- Molinuevo, HA. 1998. Selección de bovinos para sistemas de producción en pastoreo. *Portal Veterinaria. Rev. Arg. Prod. Anim.* 18(3/4):227-245.
- Molloy, JB; Bowles, PM; Knowles, DP; McElwain, TF; Bock, RE; Kingston, TG; Blight, GW; Dalgliesh, RJ. 1999. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.* 77:245-249.
- Montenegro-James, S; Toro, M; León, E; Baek, B; Guillén, A; López, A. 1990. Inducción de inmunidad protectora contra la anaplasmosis bovina usando un inmunógeno corpuscular de *Anaplasma marginale*. *Veterinaria Tropical* 15:57-76.
- Morlais, I; Ravel, S; Grébaud, P; Dumas, V; Cuny G. 2001. New molecular marker for *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* identification. *Acta Trop.* 80(3):207-13.
- Murphy, N; Pellé, R. 1997. Differential gene expression during the life cycle of *Trypanosomes* (en línea). In Roberto Aguilar MS; Silva Alberto MR Dávila. eds. *Proceedings of The First Internet Conference on Salivarian Trypanosomes*, (FAO Animal Production and Health Paper 136). Tryplink-L Discussion List. Consultado 7 oct. 2008. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/w5781e/w5781e00.htm>.
- Palmer G.H., McElwain T.F. 1995. Molecular basis for vaccine development against anaplasmosis and babesiosis. *Veterinary Parasitology* 57(1-3):233-253.
- Pance A; Giardina S. 1990. Ensayo inmunoenzimático DOT-ELISA para anaplasmosis. In Giardina, S; García, F. eds. *Hemoparásitos: Biología y diagnóstico. Cuadernos USB, Serie Biología. Venezuela.* 246 p.
- Peregrine, AS. 1994. Chemotherapy and delivery systems: haemoparasites. *Vet. Parasitol.* 54:185-203.
- Perrone, T; Lesseur, C; Reverón, I; Espinoza, E; Aso, P. 1991. Análisis seroepidemiológico de la tripanosomiasis bovina en la zona de Santa María de Ipire. *Acta Científica Venezolana* 42 (Supl. 1):208.
- Power, L; Moissant de Román, E. 1991-1992. Parasitismo por garrapata en el ganado de fincas de los estados Guárico y Apure. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela.* 38(1-8):53-61.
- Quispe, AP; Chávez, VA; Casas, AE; Trigueros, VA; Suárez, A.F. 2003. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de cuatro Distritos de la Provincia de Coronel Portillo, Ucayali. *Rev. Investig.* 14(2):161-165.
- Reifenberg, J; Solano, P; Cuisance, D; Duvallet, G. 1997. Contribution of the PCR Technique for a Better Understanding of the Epidemiology of Animal Trypanosomosis in West Africa (en línea). In Roberto Aguilar M.S. Silva Alberto M.R. Dávila eds. *Proceedings of the First Internet Conference on Salivarian Trypanosomes* (FAO Animal Production And Health Paper 136). (1996, Tryplink-L Discussion List). FAO. Consultado 7 oct. 2008. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/w5781e/w5781e00.htm>
- Reyna-Bello, A; Cloeckert, A; Vizcaíno, N; Gonzatti, M; Aso, P; Dubray, G; Zigmunt, M. 1998. Evaluation of an enzymelinked immunoabsorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 5(2): 259-262.
- Rey-Valeirón, C; Aso, P; Coronado, A. 2003. Prevalencia de *Anaplasma marginale* y anticuerpos específicos en becerros neonatos. *Acta Científica Venezolana.* 54(2):121-126.

- Ristic, M. 1971. Estructura del *Anaplasma*. In X Congreso Panamericano de Medicina Veterinaria. Maracay, Venezuela. p. 3-7.
- Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis bovinas. Editado por Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. Caracas:237.
- Sandoval, E., Espinoza, E., Valle, A. 1996. Leucopenia y trombocitopenia en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. Veterinaria Tropical. 21(1):13-33.
- Silva, RAMS; Dávila, AMR. 1997. Epizootics of Trypanosoma vivax in Bolivian Lowlands and Pantanal Region, Brazil. In Aguilar, R; Silva, MS; Dávila, MR. eds. Proceedings of The First Internet Conference on Salivarian Trypanosomes (FAO Animal Production And Health Paper 136). 1997. Tryplink-L Discussion List 9-14 December 1996. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w5781e/w5781e00.htm>.
- Tamasaukas, R. 1992a. Epidemiological diagnosis of bovine Trypanosomosis in farms of Guarico State, Venezuela. In 1st International Seminar on Non-Tsetse Transmitted Animal Trypanosomoses. Annecy, France. 194 p.
- Tamasaukas, R. 1992b. Seroprevalencia de la Trypanosomosis bovina en fincas del Estado Guárico, Venezuela. Trabajo de Ascenso Categoría Asociado. Universidad Rómulo Gallegos. San Juan de Los Morros, Guárico, Venezuela. 167 p.
- Tamasaukas, R; Roa, N. 1991-1992. Epidemiología básica agroecológica de la tripanosomiasis bovina por *T. vivax* en el estado Guárico, Venezuela. Maracay, Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela 38(1-8):143-165.
- Tamasaukas, R; González, A. 1994. Seroprevalencia de la Trypanosomiasis (*Trypanosoma vivax*) en fincas del Municipio Ortiz, estado Guárico, Venezuela. (Resultados preliminares). In VIII Congreso Venezolano de Zootecnia. San Juan de Los Morros, Guárico, Venezuela). sp.
- Tamasaukas, R. 1994. Evaluación de la técnica QBC para el diagnóstico de la trypanosomosis bovina en fincas de los estados Aragua y Guárico. Venezuela. Proyecto DL-AG-0039:45
- Tamasaukas, R. 1995a. Evaluación de la técnica QBC para el diagnóstico de la trypanosomosis bovina en fincas de los estados Aragua y Guárico, Venezuela. Proyecto FUNDACITE-Aragua DLAG-0039. (2do. Informe de Avance). 120 p.
- Tamasaukas, R. 1995b. Epidemiological agroecological diagnosis of bovine trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in farms of Guárico state, Venezuela. Research Grant Agreement No. B/2223-1. International Foundation for Science. (First Advance). 130 p.
- Tamasaukas, R. 1995c. Estudio general de la trypanosomiasis bovina (Trabajo de Ascenso). Universidad Rómulo Gallegos. San Juan de Los Morros, Venezuela. 342 p.
- Tamasaukas, R; Roa, N. 1996. Trypanosomiasis bovina por *T. vivax*: Una revisión. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias ed. Serie D. Maracay. Venezuela. 63 p.
- Tamasaukas, R; Roa, N; Ruiz, H; Rodríguez, I; Baldizán, A; Aso, PM. 1998. Valores hematológicos en infecciones naturales con *Trypanosoma vivax* en fincas bovinas del estado Guárico, Venezuela. Act. Cient. Ven. 49(Supl. 2):336.
- Tamasaukas, R; Ruiz, H; Aguirre, A; Roa, N., Cobo, M., Aso, P. 2000a. Agriecoepidemiology of trypanosomosis due *Trypanosoma vivax* in ruminants of some farms located in Venezuela: Technical note. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. 10(6):453-457.
- Tamasaukas, R; Roa, N; Aguirre, A; Ron, J; Cobo, M. 2000b. Tetralogía Hemoparasitaria en algunas Fincas Bovinas del Municipio Santa Rita, estado Guárico, Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela. 41(4):101-108.
- Tamasaukas, R; Purroy, R; Rodríguez, H; Ruiz, H; Roa, N; Labrador, C. 2002. Seroprevalencia de trypanosomosis y brucelosis bovina en fincas integradas a la producción de maíz, de la zona alta de los municipios Roscio y Ortiz, estado Guárico, Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia. 12(2):630-634.
- Tamasaukas, R; Roa, N; Cobo, M. 2006. Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en búfalos (*Bubalis bubalis*), en dos fincas del estado Guárico, Venezuela. Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia 16(6):575-578.
- Tamasaukas, R. 2008. Tetralogía hemoparasitaria en ganadería doble propósito en Venezuela. In Carlos González Stagnaro, Ninoska Madrid Bury y Eleazar Soto Belloso. eds. Desarrollo Sostenible de la Ganadería Doble Propósito. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela. p. 314-325.
- Tavares, L; Núñez, C; Reyna-Bello, A. 2004. Determinación de la seroprevalencia de anaplasmosis en ovinos y caprinos de la Estación Experimental La Iguana por medio del Ensayo Inmunoenzimático ELISA (en línea). In I Simposio Internacional. II Simposio Nacional: Hemoparásitos y sus Vectores. Caracas, Venezuela.

- Memorias. Consultado 7 oct. 2008. Disponible en <http://www.reddehemoparasitos.org.ve/protocolos/ELISA.pdf>
- Toro, M. 1990. Seroepidemiología de las Hemoparasitosis en Venezuela. In Giardina, S; García, F. eds. Hemoparásitos: Biología y Diagnóstico. Colección Cuadernos USB. Caracas, Venezuel. p. 32-49.
- Toro, M; López, R; León, E; Ruiz, A; García, J. 1980. Resultados de un muestreo serológico sobre bovinos portadores de *Babesia*, mediante inmunofluorescencia indirecta. Veterinaria Tropical 5(1):3-8.
- Toro, M; Montenegro-James, S; León Arenas, E; López-Boyer, R; Ristic, M. 1988. Babesiosis bovina: efecto inmunoprotector de un exoantígeno de *Babesia bovis* (=B argentina) obtenido mediante cultivo *in vitro*. Veterinaria Tropical 13:69-82.
- Uzcanga, G; Mendoza, M; Aso, P; Bubis J. 2002. Purification of a 64Kda antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. Parasitology 124:287-299.
- Vale, WG. 1994. Panel: Water buffalo world update prospects of buffalo production in Latin America. In Proceedings IV World Buffalo Congress. São Paulo, Brazil. Vol. 1. s.p.
- Van Der Waaij, EH; Hanotte, O; Van Arendonk, JAM; Kemp, SJ; Kennedy, D; Gibson, JP; Teale, A. 2003. Population parameters for traits defining trypanotolerance in an F2 cross of N'Dama and Boran Cattle. Livestock Production Science. 84(3):219-230.
- Velásquez de Ríos, M; Tiapé Gómez, Z; Gorayeb, I; Tamasoukas, R. 2004. Abundancia estacional de tabánidos (Diptera: Tabanidae) en el sector Las Lajas, Municipio Miranda, estado Guárico, Venezuela. Entomotropica. 19(3):149-152.
- Ventura, RM; Paiva, F; Silva, RAMS; Takeda, GF; Buck, GA; Teixeira, MMG. 2001. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. Exp. Parasitol. 99(1):37-48.
- Wanduragala, L; Ristic, M. 1993. Anaplasmosis. In Woldehiwet, Z; Ristic, M. eds. Rickettsial and Chlamydial diseases of domestic animals. Pergamon Press, Great Britain. p. 65-87.
- Zaugg, JL. 1985. Bovine anaplasmosis: transplacental transmission as it relates to stage of gestation. Am. J. Vet. Res. 46:570-572.