



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA
DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS

TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS ANTIGÉNICOS ESPECIE- ESPECÍFICOS DE *Trypanosoma vivax* PARA SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO POR ELISA DE LA TRIPANOSOMOSIS BOVINA



Rita L. TAMASAUKAS, MV, MSc
Estudiante Graduada

Sergio RIVERA, MV, Dr.
Tutor

Comité Asesor
Margarita COBO, Dra
Francisco ANGULO, Dr.
Fernando RIVERA, Dr.
Héctor RUÍZ, MV, MSc

10 de Marzo de 2017



TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO...	2
ACTA DE VEREDICTO APROBACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL...	5
LISTA DE FIGURAS...	7
LISTA DE GRÁFICOS...	9
LISTA DE TABLAS...	10
RESUMEN...	11
1. JUSTIFICACIÓN...	12
Introducción...	12
2. MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS: REVISIÓN DE LITERATURA...	16
Importancia económica de la tripanosomosis bovina...	16
Importancia del desarrollo de técnicas de diagnóstico de la tripanosomosis bovina...	22
Repetibilidad y Reproducibilidad de Resultados en Ensayos de Medición...	30
3. PROBLEMA CIENTÍFICO...	32
Objetivo General...	32
Objetivos específicos...	32
4. HIPÓTESIS...	32
5. METODOLOGÍA...	33
<u>Materiales y Métodos...</u>	33
<i>Zona Geográfica...</i>	33
<i>Fincas de Muestreo...</i>	33
<i>Descripción de las Zonas geográficas de estudio...</i>	34
<i>Aspectos Bio-Éticos...</i>	36
<i>Declaración de No Conflicto de Intereses...</i>	36
<i>Derechos de Autor...</i>	36
<i>Tamaño de la muestra experimental de animales de campo...</i>	36
<i>Animales Experimentales...</i>	37
<i>Diagnóstico Participativo...</i>	39
<i>Caracterización Racial...</i>	39
<i>Evaluación Clínica...</i>	41
<i>Toma de Muestras...</i>	44



<i>Valores Hemáticos</i> ...	45
<i>Diagnóstico Parasitológico</i> ...	46
<i>Diagnóstico Serológico</i> ...	46
<i>Material Parasitológico</i> ...	46
<u>Designación de los materiales parasitológicos</u> ...	46
<u>Términos Generales</u> ...	46
<u>Designación de Materiales Parasitológicos</u> ...	46
<u>Términos que impliquen caracterización</u> ...	47
• <u>Términos no relacionados a la Taxonomía</u> ...	47
<i>Parásitos</i> ...	48
<i>Determinación de Parasitemia</i> ...	48
<i>Animales Experimentales de Laboratorio</i> ...	48
<i>Técnicas de aislamiento y concentración de tripanosomas salivarios mediante columnas de intercambio aniónico de DEAE-celulosa previamente separados por gradiente de Percoll</i> ...	51
<i>Técnica de Anticuerpos Policlonales anti-Trypanosoma vivax</i> ...	56
<i>Sueros Controles y de Referencia</i> ...	57
<i>Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)</i> ...	57
<i>Criopreservación de Parásitos y sus Productos</i> ...	61
<i>Técnica de Ac-ELISA heteróloga</i> ...	61
<i>Técnica de ELISA homóloga</i> ...	62
<i>Evaluación del Desempeño del ELISA homóloga</i> ...	63
<i>Pruebas de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos</i> ...	64
<i>Ensayos de Repetibilidad/Reproducibilidad</i> ...	66
<i>Métodos Estadísticos</i> ...	66
<i>Determinación de la Prevalencia (Seroprevalencia) Relativa General</i> ...	66
<i>Determinación de la Prevalencia (Seroprevalencia) Relativa por Finca</i> ...	66
<i>Determinación de la Prevalencia (Seroprevalencia) Relativa por Estado</i> ...	66
<i>Reacción de la Polimerasa (PCR)</i> ...	69



Detección de *T. vivax*...69

Electroforesis...70

Controles de Reacción...70

6. RESULTADOS ...70

*Evaluación de Extractos Antigénicos de *T. vivax**...70

Parásitos...70

Designación de Materiales Parasitológicos...72

*Preparación de Antígenos de *T. vivax**...72

Ac ELISA homóloga...73

*Validación del Ac ELISA con los Extractos Antigénicos de *T. vivax**...76

Principales características resultantes de la encuesta aplicada en la RSIP de Valle de La Cruz...77

Principales características resultantes de la encuesta aplicada en la RSIP de Carmen de Cura...80

Valores Hemáticos...84

Diagnóstico Parasitológico...86

Prevalencia y Parasitemia...86

Seroprevalencia...88

*Valores de Absorbancia (D.O.) de las réplicas por tipo de extracto antigénico de *T. vivax**...98

PCR...102

7. DISCUSIÓN...105

8. CONCLUSIONES ...130

Agradecimientos y Financiamiento...131

9. BIBLIOGRAFÍA...133

ANEXOS...159

Anexo 1. Productividad Doctorado en Ciencias Veterinarias FCV-UCV. Período 2010 – 2016 (Componente: Hemotrópicos- Tripanosomosis) Rita Tamasaukas...161

Anexo 2. Corridas en EPIDAT 3.1. Ejemplos...172



ACTA DE VEREDICTO APROBACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **Tesis Doctoral** presentada por: **RITA LAIMA TAMASAUUKAS**, Cédula de identidad N° 4.228.028, bajo el título "EVALUACIÓN DE PRODUCTOS ANTIGÉNICOS ESPECIE-ESPECÍFICOS DE *Trypanosoma vivax* PARA SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO POR ELISA DE LA TRIPANOSOMOSIS BOVINA", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 10 de marzo de 2017 a las 10:00 a.m., para que la autora lo defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en el Salón de Conferencias del Instituto de Reproducción Animal "Dr. Abraham Hernández Prado", mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO**, por considerar, sin hacerse solidario con las ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado.


Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado constituye un aporte significativo al área del conocimiento y aplicación práctica en el diagnóstico de campo de la tripanosomosis causada por el *Trypanosoma vivax*. Las publicaciones y presentaciones derivadas de esta tesis doctoral le añaden un importante significado científico y tecnológico.


[Handwritten signatures and initials: RA, RB, PSL, MK]








En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 10 días del mes de marzo del año 2017, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinador del jurado el Dr. Sergio Rivera, de la FCV-LUZ.


 MC Ph.D. Andrés Soyano
 C.I. No. V- 2.589.586
 IVIC
 Jurado designado por el Consejo de la Facultad


 Lcda. Ph.D. Mary Isabel Gonzatti
 C.I. No. V- 4.579.227
 USB
 Jurado designado por el Consejo de la Facultad


 Lcdo. Dr. Roschman González
 C.I. No. V- 13.608.453
 FC-UCV
 Jurado designado por el Consejo de Estudios de Postgrado


 M.V. Dra. Jessica Quijada
 C.I. No. V- 11.985.126
 FCV-UCV
 Jurado designado por el Consejo de Estudios de Postgrado


 MV Dr. Sergio Rivera
 C.I. No. V- 4.521.140
 FCV-LUZ
 Tutor



AS/MIG/RG/JQ/SR
 10/03/17
 2/2



LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Animales experimentales, contenidos en el corral, preparándose para el muestreo y revisión clínica. Lugar Finca La Laguna, Carmen de Cura, Municipio Camatagua, estado Aragua...38
- Figura 2. Animales experimentales, preparándose para el muestreo y revisión clínica. Guárico...39
- Figura 3. Composición Racial de Rebaños Bovinos en Predios bajo estudio. (Fuente: Propia)...40
- Figura 4. Diagnóstico Clínico. Lugar Finca La Laguna, Carmen de Cura, Municipio Camatagua, estado Aragua. 2013...42
- Figura 5. Evaluación de mucosa gingival...42
- Figura 6. Pesaje con romana de animales de los grupos experimentales...43
- Figura 7. Pesaje con cinta pesadora de animales de los grupos experimentales...43
- Figura 8. Preparación para toma de muestras en campo...44
- Figura 9. Toma de muestras de sangre en campo a los animales...44
- Figura 10. Procesamiento de las Muestras para los análisis Hematológicos y de Hemotrópicos. QBC Idexx®. LABIPRESAN, San Juan de los Morros. Estado Guárico...45
- Figura 11. *Trypanosoma vivax* en Frotis de sangre completa coloreado con Giemsa al 10% (100x Contraste de Fase)...47
- Figura 12. Procesador ultrasónico de células (sonicador)...51
- Figura 13. *Trypanosoma vivax* (flecha indicadora) en fresco observado a 100X contraste de fase...52
- Figura 14. Sangre completa de la sangría de los animales inoculados...53
- Figura 15. Preparación de la columna de DEAE-celulosa para separación de los parásitos...54
- Figura 16. Columna de DEAE-Celulosa con sangre infectada por *T. vivax* para aislamiento y purificación...55
- Figura 17. *T. vivax* aislados y purificados...56
- Figura 18. Distribución de los Sueros en IFI...60
- Figura 19. Protocolo Placas de Ac-ELISA *T. vivax* homóloga...63



- Figura 20. Placa de Ac-ELISA, los pocillos con colores verdes son muestras positivas...76
- Figura 21. Finca de productores de la RSIP de Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua. Al margen del río Cura. 2013...83
- Figura 22. Potreros de la RSIP de Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua, con cultivos alternativos. 2013...83
- Figura 23. Panorámica General de los potreros de la RSIP de Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua. 2013...84
- Figura 24. Panorámica General de los potreros al margen del río Carmen de Cura, de la RSIP Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua. 2013...84
- Figura 25. Suero fuertemente positivo a *T. vivax* en IFI (100X)...94
- Figura 26. Valores de Densidades Ópticas en un ensayo de Ac-ELISA: Extracto Crudo Total...100
- Figura 27. Valores de Densidades Ópticas en un ensayo de Ac-ELISA: Extracto Soluble Citosólico Fraccionado Purificado...101
- Figura 28. Valores de Densidades Ópticas en un ensayo de Ac-ELISA: Extracto Desnaturalizado...102
- Figura 29. Corrida electroforética en gel de agarosa con extractos antigénicos especie-específicos de *T. vivax* (ExCT, ExD, ExSCPF 20µg, ExSCPF 40µg)...103
- Figura 30. Corrida electroforética en gel de agarosa con extractos antigénicos especie-específicos de *T. vivax* (ExSCPF 20µg y 40µg)...104
- Figura 31. Corrida electroforética en gel de agarosa con control de antígenos especie-específicos de *T. vivax* contrastados con *T. brucei*, *T. congolense forest*, *T. congolense savannah*, controles positivos y negativos a *T.vivax*...105
- Figura 32. Dendograma de distancia genética de especies de *Trypanosoma* spp Salivaria...123
- Figura 33. Topología del árbol filogenético basado en el análisis de máxima verosimilitud de secuencias SSU y (V7-V8+5.8S) de ADNr de aislados de *Trypanosoma vivax* y otras especies de tripanosomas Salivaria...125



LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Ac-ELISA *T. vivax* 40 μ g vs *T. evansi*...92

Gráfico 2. Ac-ELISA *T. vivax* 20 μ g vs *T. evansi*...92

Gráfico 3. Ac-ELISA *T. vivax* 40 μ g vs *T. vivax* 20 μ g...93

Gráfico 4. Ac-ELISA *T. vivax* 40 μ g vs *T. vivax* 20 μ g vs *T. evansi*...93



LISTA DE TABLAS

- Tabla I.- Estimación de la Parasitemia de Infecciones por *Trypanosoma* spp...48
- Tabla II. Tabla de contingencia de doble entrada para la validación de la prueba de Ac-ELISA *T. vivax* con la prueba de IFI-*T. vivax* para la misma muestra de sueros...65
- Tabla III. Tabla de Contingencia Extracto *T. vivax* ExSCPF 40µg...76
- Tabla IV. Tabla de Contingencia Extracto *T. vivax* ExSCPF 20µg...77
- Tabla V. Resumen de Distribución de Frecuencias de Hematocrito por Grupo. Guárico...85
- Tabla VI. Valores Promedios de Hematocrito (%) por Grupo, Época y Mes. Guárico...86
- Tabla VII. Prevalencia *Trypanosoma vivax* entre Municipio. Estado Guárico...87
- Tabla VIII. Prevalencia y Seroprevalencia de *T. vivax* en 05 estados de la Región Centro Llanera de Venezuela -Ac ELISA con Extractos antigénicos de *T. evansi* y de *T. vivax*...88
- Tabla IX. Valores de Seroprevalencia *Trypanosoma vivax* por finca / municipio Estado Guárico...89
- Tabla X. Valores por Finca de la Seroprevalencia (SP) por Ac-ELISA en 20 fincas con Extracto especie-específico de *T. vivax* (ExSCPF 20µg y 40µg) y Extracto *T. evansi*...89
- Tabla XI. Valores por Estado de la Seroprevalencia (SP) por Ac-ELISA en 20 fincas con Extracto especie-específico de *T. vivax* (ExSCPF 20µg y 40µg) y Extracto *T. evansi*...91
- Tabla XII. Valores de sensibilidad, especificidad y concordancia en ensayo Ac-ELISA homólogo con 40µg/ml de extracto antigénico especie-específico de *T. vivax*. Ensayo de validación (EPIDAT 3.1)...97
- Tabla XIII. Variación intra y entre ensayos de la Ac-ELISA con extracto antigénico especie-específico de *Trypanosoma vivax* para la detección de anticuerpos anti-*T. vivax*...98
- Tabla XIV. Valores de Absorbancia (Densidades Ópticas) en las Réplicas Intra e Inter-Ensayos...99



RESUMEN

Con el propósito de lograr respuestas a los problemas de baja eficiencia de los métodos directos de diagnóstico de la tripanosomosis bovina, se planteó la evaluación de tres extractos antigénicos provenientes de aislados del estado Guárico de *Trypanosoma vivax*, su aplicación en la técnica de ELISA indirecto para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina, con la determinación de los indicadores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo, y otros indicadores. Apoyado en un estudio agropecoepidemiológico de la tripanosomosis en varios predios de ganado bovino doble propósito en 05 estados Apure, Aragua, Barinas, Cojedes y Guárico de los Llanos Centrales de Venezuela a los fines de la evaluación de los materiales antigénicos en el diagnóstico en campo. Con valores de prevalencia de 37,7% a *T.vivax* y seroprevalencia considerable alta por ambas metodologías (Ac-ELISA: 88,65%; IFI: 88,80%), aunque sin diferencia estadística significativa entre ambas técnicas ($P < 0,05$). Con valores de Hto $\leq 30 \geq 25\%$, estableciendo como anémicos aquellos animales con Hto igual o menor a 30%. El ANAVAR mostró diferencias significativas para tratamientos y épocas, pero no para la interacción tratamiento-época: Con valores de Hb ≤ 10 y $\geq 8,01$ g/dL, estableciendo como anémicos aquellos animales con una Hb igual o menor a 10g/dL. El protocolo de Ac-ELISA homólogo empleado, con extractos solubles purificados especie-específicos de *T.vivax* (20 μ g/ml) bajo el proceso de producción de calidad fue eficiente, mostrando una sensibilidad del 95% y especificidad del 96%, concordancia del 97% e índice kappa de 0,93 en base a sueros de referencia (100 positivos y 100 negativos). En tanto el ensayo con 40 μ g/ml de antígeno especie-específico (extracto soluble purificado fraccionado), se obtuvo mejores resultados, con especificidad de 97% y sensibilidad 96% y al ser evaluados con los sueros controles, bajo las condiciones de estandarización con 100 sueros controles, 97 sueros negativos y 96 positivos coincidieron con los resultados de referencia, lo que representó 97% de concordancia con índice Kappa de 0,93. En cuanto a la repetibilidad/reproducibilidad de los ensayos, se observa que todos los valores presentaron coeficientes de variación menores al 13% establecido como estándar válido. Así mismo, en la repetibilidad del ensayo (intra ensayo) el coeficiente de variación presentó valores mucho menores (2,80 a 6,00%) que los observados en la reproducibilidad del ensayo (entre ensayos) cuyos valor máximo fue de 10%. En el Ac-ELISA se obtuvo puntos de corte variables, con valor mínimo de 0,209 y máximo de 0,583, con los mayores valores de densidad óptica (OD) en el caso de las réplicas con los extractos solubles purificados fraccionados de *T. vivax*. Los tres productos antigénicos, especie-específico de *T. vivax* mostraron en la Ac-ELISA y en la IFI, altos grados de sensibilidad y especificidad por lo que el método de producción de antígenos resultó eficiente para el diagnóstico de anticuerpos anti-*T. vivax*. La técnica de Ac-ELISA desarrollada mostró ser robusta visto los datos de repetibilidad/reproducibilidad así como los de estandarización de la misma, lo cual le otorga un valor para ser utilizada en la producción de estuches en serie industrial. Los resultados de alta prevalencia y seroprevalencia reafirman la condición endémica (enzoótica) de la tripanosomosis en la región llanera el país.

Palabras clave: Tripanosomosis; *Trypanosoma vivax*; antígenos especie-específicos; Ac-ELISA; inmunoensayo enzimático indirecto; agroecopeidemiología



1. JUSTIFICACIÓN

Introducción.

Los estudios han indicado que dentro de las enfermedades que afectan al ganado, la Tripanosomosis constituye una limitante importante de la producción bovina; en especial en los estados tradicionalmente ganaderos, Guárico, Apure, Zulia y Sur de Aragua, de acuerdo a su alta y variada prevalencia; estimada en un 33,8% en el Guárico por Tamasaukas (1992a; b) en la temporada lluviosa (julio a octubre) en las regiones norte, centro y sur del oriente del estado; de un 3,63% en temporada seca en fincas del Municipio Ortíz del nor-occidente del estado Guárico (Tamasaukas y González, 1994).

La importancia de estos agentes parasitarios, por tener impacto negativo en los sistemas de producción bovina y bufalina, por los altos costos por fallecimiento, pérdidas productivas, reproductivas, medidas preventivas y curativas en animales enfermos y muerte, nos ha motivado para ofrecer una revisión sobre la situación actual, avances y perspectivas en el estudio, diagnóstico y control de la tripanosomosis para un desarrollo sustentable. (Tamasaukas, 2008; San Juan-Lions, 2010).

Gran parte de las razas del rebaño bovino del oeste del África: N'dama, Baoulé, Lagune (Lagoon), Bourgou, Muturu, Dahomey (Daomé), Somba, Namchi, Kapsiki. Kuri, Toupouri, Ghana Shorthorn, Keteku, Somba East Africa Sheko, Jiddu son resistentes a la tripanosomosis (FAO, 2007).

El término tripanotolerancia viene dado porque los animales son capaces de mantener los valores del hematocrito y controlar la tasa de crecimiento de la consecuente infección, mantener el peso de los animales infectados, así como contrarrestar los efectos negativos de la infección por el *Trypanosoma vivax*. Estos aspectos son considerados indicadores de esta condición genética y hereditaria. (Tamasaukas *et al.*, 2010).



Así que, la tripanotolerancia es una condición genética por medio de la cual los bovinos con Tripanosomosis conviven con la enfermedad sin verse afectados por los efectos adversos, dichos animales, de algunas especies y razas ganaderas, tienen la habilidad de sobrevivencia, reproducción y producción bajo riesgo de la tripanosomosis. Esta condición ha sido bien conocida y explotada por ganaderos en el África, mucho antes que investigadores comenzaran a estudiar en forma científica, acerca de los mecanismos que determinan esta tolerancia a las infecciones por tripanosoma. (d'Ieteren *et al.*, 1998; CIP-UPWARD, 2003; van der Waaij *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2005).

Por ello, es una estrategia de importante desarrollo en los países africanos para rescatar de la extinción los genes que codifican para esta condición que viene a ser una de las medidas más promisorias para el control de la tripanosomosis, que presenta una prevalencia promedio del 14% y que es la principal limitante de la producción bovina, sobre todo en las regiones que comprende la zona sub-tropical de la mosca tsé-tsé.

La tripanotolerancia es un carácter 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, como control a una de las enfermedades de mayor importancia en la región y complementar la selección y programas de cruzamiento que se vienen realizando a nivel de productores e instituciones públicas y privadas. (FAO, 2008; Tamasaukas *et al.*, 2012).

La mayor frecuencia de animales positivos a *Trypanosoma vivax* se encuentra en animales de razas importadas, principalmente Holstein, Pardo Suizo, y otras de origen *indicus*. Esto puede atribuirse a que son animales altamente susceptibles y a la pérdida por los cruces, de la condición de tripanotolerancia, como ha sido evidenciado en los países africanos. Una condición para realizar la identificación de animales tripanotolerantes y tripanosusceptibles, es la valoración del reto parasitario al cual los animales están expuestos en condiciones naturales. (Tamasaukas *et al.*, 2010).



Por ello, para la prevalencia de la tripanosomosis 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 (Tamasaukas *et al.*, 2010).

Reforzado por el hecho de los variables valores encontrados por diversos autores en las diferentes regiones del país, según la época del año y rebaños muestreados, visto que se evidenciaron amplias diferencias entre los hallazgos parasitológicos y serológicos, siendo la tasa de infección activa general para *T. vivax* de 5,9%, mientras que la tasa general de seroprevalencia (SP) fue 33,1%. Este valor fue mayor al obtenido por Toro *et al.* (1980), quienes registraron una SP general de 25,5% en un amplio muestreo (1.884 muestras, 39 fincas, 9 estados y en diferentes regiones). (Suárez *et al.*, 2009).

En otro estudio, González y Meléndez (2007), se obtuvo una SP de 37,5% en bovinos del estado Carabobo. Estos trabajos demuestran la extensa distribución geográfica de la tripanosomosis en rebaños vacunos de Venezuela en distintos sistemas de producción (leche, carne y doble propósito).

Los hemotrópicos en Venezuela son un problema importante para la salud de bovinos con prevalencia de 25 a 50% para *Trypanosoma vivax*, 64,8% de seroprevalencia para Babesiosis mientras que para *Anaplasma marginale* la seroprevalencia tiene un promedio nacional de 47,6%.

En los rebaños bovinos doble propósito en Venezuela con presencia de vectores de estos hemotrópicos (*Tabanus* spp., moscas, garrapatas) se puede evidenciar animales con baja condición corporal y mucosas pálidas, no necesariamente relacionadas con parasitemia de estos hemotrópicos, ya que también hay efecto de la carencia nutricional. (Tamasaukas *et al.*, 2010).



Uno de los principales problemas que generan los hemotrópicos con énfasis en tripanosomosis en los bovinos que la padecen es una anemia la cual según sus niveles puede generar desde descensos considerables en niveles de producción y reproducción inclusive llegar hasta la muerte. El resultado dependerá del manejo alimenticio y sanitario (preventivo y curativo) que tengan los animales así como las características genéticas propias según la raza de los animales (Murray *et al.*, 1983; Osório *et al.*, 2008).

Los medios más comunes para detectar infecciones por *T. vivax*, *A. marginale* y *Babesia spp.*, 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; Osório *et al.*, 2008).

La técnica de Woo se ha utilizado básicamente para determinar la prevalencia mientras que la técnica de frotis tiene como principal objetivo identificar la especie de tripanosoma ya que permite una mejor visualización de la estructuras del parásito (Quispe *et al.*, 2003; Osório *et al.*, 2008).

Los métodos serológicos como el ensayo inmunoenzimático indirecto con antígenos derivados de *T. evansi* (*T.evansi*-Ac-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 la *T.evansi*-Ac-ELISA no diferenciar entre reacciones cruzadas con otros patógenos con los que *T. vivax* comparte similitud antigénica como *T.evansi* y *T. theileri* (Desquesnes 1997, Morlais *et al.*, 2001; Osório *et al.*, 2008).

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 tripanosomosis por *T. vivax* (Uzcanga *et al.* 2002).



Sin embargo, esto genera inconvenientes en zonas donde la tripanosomosis 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 esta fase, tuvo como propósito presentar avances de la evaluación en campo de productos antigénicos especie-específicos de *T. vivax* para el diagnóstico por ELISA y la obtención de una base de datos actualizados sobre la caracterización agroecológica y epidemiológica de la tripanosomosis bovina que pueden ser utilizadas por los productores y las productoras, universidades, planificadores y planificadoras agrícolas, escuelas campesinas y específicamente por las Redes Socialistas de Innovación Productiva incluidas en este estudio, entre otros usuarios, como parte de los objetivos previstos en la tesis doctoral: "Evaluación de productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para su aplicación en el diagnóstico por ELISA de la tripanosomosis bovina"

2. MARCO TEÓRICO E HIPÓTESIS: REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia económica de la tripanosomosis bovina.

En un estudio de los aspectos clínicos y el impacto económico que tiene la tripanosomosis animal, Camus (1992) dice que es muy difícil de separar la tripanosomosis de otras hemoparasitosis (babesiosis, anaplasmosis) ya que por lo general van concatenadas; al respecto, Tamasaukas *et al.* (2000a) reportan la denominación de tetralogía hemoparasitaria, por observarse durante años en fincas bovinas localizadas en el municipio Santa Rita la presentación en los animales muestreados, infecciones activas concomitantes de anaplasmosis (*Anaplasma marginale*), babesiosis (*Babesia bigemina*, *B. bovis*) y tripanosomosis (*T. vivax*) con valores de 25 a 50% de seroprevalencia a *T. vivax* por Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Diversos autores han indicado que la tripanosomosis bovina, al igual que la anaplasmosis y la babesiosis, son las enfermedades hemotrópicas de mayor distribución y prevalencia en toda Venezuela, afectando a los animales de todas las razas, sin distinción de sexo ni edad,



y en diferentes tipos de explotación (Schroeder *et al.*, 1971; Toro *et al.*, 1980; James *et al.*, 1985; Omamo *et al.*, 2000).

Los reportes del ICA (citados por Otte, 1991) señalan que las pérdidas económicas por la tripanosomosis bovina en Colombia alcanzaron en 1980 un total estimado de \$US 50.684.000 en la industria pecuaria, ubicando las autoridades regionales de sanidad animal a esta enfermedad como el tercer complejo de enfermedades más importante en este país sud-americano.

Mientras que para América Latina han sido estimadas en más de 800 millones de dólares anuales por hematozoarios en general (Lonibardo en 1976, citado por Toro, 1990) y mundialmente dichas enfermedades han sido reportadas como problemas graves en más del 70% de los países en vías de desarrollo (Animal Health Yearbook en 1981, citado por Toro, 1990; Osório *et al.*, 2008).

En un brote de tripanosomosis por *T. vivax* en seis fincas bovinas en Colombia, que ocurrió en 1979, enfermaron 209 animales de 1.380, de los cuales murieron 32 y ocurrieron 15 abortos, estimándose las pérdidas económicas en unos \$US 100.000 (Benavides y Wells, citados por Mateus *et al.*, 1992).

Comparados con el gran volumen de literatura concerniente a los aspectos biológicos de la tripanosomosis, se han publicado muy pocos trabajos sobre las implicaciones económicas de la enfermedad; esta escasez se relaciona no solo con el impacto de la infección a nivel regional o nacional, sino también con su repercusión a nivel de finca. (Omamo *et al.*, 2000) Siendo por lo menos necesario la evaluación de este último como "impacto financiero" de la tripanosomosis según lo define Grindle en 1985 (citado por Otte, 1991), con el fin de ofrecer al productor una orientación adecuada para la toma de decisiones de cómo hacer un mejor uso de sus recursos.



En general, los sistemas de producción que operan a diferentes niveles de intensidad responden en una forma distinta a los cambios en uno y en el mismo parámetro de producción según lo expresó McInerney en 1988 (citado por Otte, 1991). Reconociendo este potencial de variación, Otte (1991) evaluó el posible impacto de las infestaciones parasitarias en empresas ganaderas de doble propósito en la región de Córdoba, Colombia, en fincas "tradicionales" y en fincas "mejoradas", tipificadas por el grado de mejoramiento genético con sangre europea o norteamericana *Bos taurus* para aumentar la producción de leche. (Otte, 1992).

Teniendo como resultados Otte (1991; 1992) que la tripanosomosis bovina es endémica (con esta denominación pretende denotar una situación en la cual virtualmente todos los terneros adquieren la infección con *T. vivax* durante el primer año de vida).

Su ensayo de intervención demostró que las infecciones primarias con *T. vivax* estaban asociadas con una reducción promedio de la ganancia de peso de 5 a 10 kg en las tres fincas donde los terneros se monitorearon desde el momento de su nacimiento.

Como durante los seis meses siguientes a la infección primaria no se hizo evidente una ganancia compensatoria significativa, se evaluó el efecto de la tripanosomosis sobre la base de reducciones del orden de 5, 7,5 y 10 kg en peso de novillos de un año y un retardo correspondiente en la edad al primer parto en las novillas.

Bajo supuestas condiciones de "libre de tripanosomosis" el valor de la producción vendible, a un incremento de peso estimado en 7,5 kg se aumenta en \$291 y \$231 por UCC (Unidad de Capacidad de Carga) por año en los hatos con sistemas "tradicionales" y "mejorados" respectivamente.

Estos valores no consideran la posibilidad de reducción posterior de la edad al primer parto. Asumiendo una reducción adicional en esta última de 3,5 a 3,4 años, el "costo" del *T. vivax* sería de \$557 por UCC por año en los hatos "tradicionales" y de \$500 por UCC por año en



los hatos "mejorados". Presumiéndose que los efectos en la fertilidad y en la producción de leche pudieran ser proporcionales al efecto estimado en los bovinos en crecimiento (Otte, 1991; 1992).

Pudiera pensarse que, las epidemias localizadas de *T. vivax* no tuvieran mayor significancia económica si las pérdidas son "promediadas" para toda una región, pero realmente son de importancia para el productor en particular que resulte afectado.

El ganadero a nivel individual probablemente no esté interesado solamente en la magnitud de las pérdidas atribuidas a cierta enfermedad, sino también en la distribución temporal de las mismas. Podría estar más preocupado por una enfermedad que causa poco daño con el correr de los tiempos pero que esporádica e impredeciblemente produce pérdidas severas, que por una enfermedad cuyas pérdidas estén distribuidas uniformemente durante todo el año. En este aspecto, el *T. vivax* ocupa un papel único entre los parásitos encontrados en la región de Córdoba en Colombia (Otte, 1991; 1992; Otte *et al.*, 1994).

En tanto, la tripanosomosis ha sido catalogada como la tercera enfermedad de importancia económica en Colombia (Camus, 1992).

Señalando Mürphy (1995) que, los científicos estiman 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 tripanosomas. En tanto que, Seidl *et al.* (1999) las estimaron en un nivel de US\$ 140.000 en brotes no tratados en siete predios, extrapolarlo la valoración en US\$ 200.000.000 en la región del Pantanal y US \$700.000.000 en toda la región de los llanos brasileros y bolivianos.

Estimando 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. (Mürphy, 1995).

En Venezuela, por la carencia de datos oficiales, y la necesidad de diseñar un instrumento ajustado a las condiciones características del llano venezolano que permitiera estimar el impacto económico generado por la tripanosomosis bovina en el sector ganadero venezolano, se planteó como propósito, el diseño y aplicación de un modelo de experimentación estratégica para el estudio agroepidemiológico y económico-productivo de la tripanosomosis por *T. vivax*, en condiciones de campo, en un sistema de producción doble propósito (SPB DP) ubicado en el Municipio Miranda del estado Guárico, Venezuela. (Tamasaukas *et al.*, 2014)

Logrando confirmar la condición enzoótica de la Tripanosomosis bovina por *T. vivax* en el estado Guárico, a pesar de la diversidad de unidades agroecológicas donde se encuentran los SPB DP, composición del rebaño, prácticas de manejo de las fincas, entre otros factores.

En cuanto al modelo de valoración económica bajo enfoque de experimentación estratégica modificado para evaluar las pérdidas económicas, fue efectivo para detectarlas tomando en cuenta principalmente, el indicador bioproductivo de peso.

Permitiendo pérdidas económicas, sólo por pérdidas de peso, en el orden de BsF 169.632,00 (US\$ 26,926.00 al cambio oficial de US\$ 1 = BsF 6,30); al extrapolar el valor de pérdidas en los 18 animales para el rebaño total de 200 animales expuestos a riesgo en un período de un año de ensayo; aun cuando no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas entre los cambios de peso por tratamiento. (Tamasaukas *et al.*, 2014).

Por otra parte, estos autores, concluyen en que, en cuanto al beneficio ganancia en salud, se puede indicar que el tratamiento basado en diagnósticos sistemáticos y la presencia de la tripanotolerancia, fueron los elementos más resaltantes del modelo de experimentación estratégica, dado que reveló que el tratamiento preventivo *per se* sin diagnóstico que se



realiza en muchos sistemas de producción DP no dan garantías de frenar las infecciones por *T. vivax*, pues pueden haber problemas de resistencia al fármaco, ni tampoco el tratamiento curativo lo demostró en el presente trabajo, por el contrario, el grupo centinela donde fue mayor prevalencia y parasitemia del parásito, no pudiendo el fármaco controlar las infecciones recurrentes ni en el grupo tratado ni en el grupo centinela.

Tampoco observaron efecto de la droga en el mantenimiento de los pesos de los animales que lo perdieron, pues hubo infecciones parasitarias y los animales de todos los grupos lograron superar estas pérdidas por compensación, aunado al comportamiento del parásito en épocas de estrés de buscar refugios extravasculares, hecho que se evidencia en los gráficos de los valores parasitarios, hemáticos y pesos, sin tener relación significativa con los momentos de aplicación del fármaco, bien como preventivo o como curativo.

La seroprevalencia promedio general del grupo experimental determinada por la técnica de Ac-ELISA se ubicó en 54,67%, mientras que la prevalencia general promedio por la técnica de Woo fue de 0,87%. (Tamasaukas *et al.*, 2014).

Indicando que, los valores observados de prevalencia y seroprevalencia, así como los hemáticos y bioproductivos, en la finca piloto, orientan hacia la estabilidad enzoótica de la tripanosomosis bovina por *T. vivax* en la finca, por la condición observada de tripanotolerancia en el estudio longitudinal, aunada a los antecedentes en la unidad de producción.

Importancia del desarrollo de técnicas de diagnóstico de la tripanosomosis bovina

El flujo comercial de ganado entre países endémicos de la tripanosomosis, como por ejemplo en la actualidad, Brasil, Colombia, Argentina, Uruguay, entre otros, establece un reto para el seguimiento epidemiológico de esta enfermedad parasitaria. Dada la ausencia de vacunas para prevenir su instauración, y vistas las diferencias antigénicas y patogénicas de cepas del hemoparásito en cada región del continente, y hasta de cepas locales, nos



señala el camino inmediato, para el desarrollo, validación de estuches para el diagnóstico poblacional de esta hemoparasitosis.

Esta acepción es de vital importancia, pues existe el riesgo de que los animales introducidos, puedan servir de reservorios de cepas del país de origen, ser susceptibles en mayor grado a las cepas locales, lo que se traduciría en peligros de expansión del parásito que ganaría nichos ecológicos para su mantenimiento, así como posibles brotes agudos de la enfermedad, a pesar de predominar la forma crónica.

Al respecto, Van den Bossche (2001) en un estudios sobre aspectos epidemiológicos de la tripanosomosis bovina en el sur del África refiere que la introducción de animales limpios en áreas donde circula el parásito y/o sus vectores puede influir en el impacto de la infección sobre la producción animal de manera importante.

La solución a este reto de manera efectiva y eficiente, es la ejecución de estrategias biotecnológicas para mejorar el diagnóstico a nivel de campo, para dar respuestas inmediatas a los productores y proveerlos de los mecanismos de profilaxis, bien sea por métodos quimioprofilácticos o por medidas de control integral, que abarque la incorporación de las buenas prácticas para el manejo de los rebaños, el control integrado de plagas (posibles trasmisoras vectoriales del *T. vivax*: mosquilla, tábanos, etc.), entre otras.

Otra estrategia de control de la tripanosomosis es la de 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., hecho 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).



Dentro de estas estrategias, sin duda alguna las que ofrecen un futuro muy promisorio en términos mediatos, es el desarrollo de los estuches de ELISA (Ag-ELISA y Ac-ELISA), tiras reactivas y su imbricación con la PCR para la obtención de los antígenos de calidad de *T. vivax*.

Las investigaciones ejecutadas a la fecha, dan cuenta de avances en la aplicabilidad de la ELISA para el diagnóstico del *T. vivax*, aunque buena parte de esos trabajos se han orientado a la búsqueda de determinantes antigénicos de una especie que afecta principalmente a los equinos, el *T. evansi*, con la finalidad de su utilización como fuentes de Ag para la ELISA dada su supuesta válida reactividad cruzada con Ac derivados de la respuesta inmune ante una exposición al *T. vivax*.

Estos 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 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polimerase Chain Reaction) y la determinación de la variabilidad patogénica en ellas, se avanzaría pues podrían establecerse los árboles filogénicos del *T. vivax* (Reifenberg *et al.*, 1997) y derivar los productos antigénicos específicos del parásito, para su aplicación en protocolos de ELISA y desarrollar a posteriori, 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 tripanosomas 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. (Mürphy y Pellé, 1997; Osório *et al.*, 2008).

Para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el control de la proliferación y diferenciación de los tripanosomas, Mürphy 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 tripanosomas 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. (Osório *et al.*, 2008).

Así, 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 tripanosomas 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. (Mürphy y Pellé, 1997)

Estas 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. (Mürphy y Pellé, 1997).

Por otra parte, estudios biomoleculares de especies de tripanosomas 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.

Estos productos (obtenidos por PCR-RADES), homólogos de las ciclofilinas de los tripanosomas constituyen una familia altamente conservada encontrada en una gran variedad de organismos y juegan un importante rol en la maduración y correcto plegamiento de las moléculas receptoras. Finalizando la década de los 90's, se puso en evidencia que los macrófagos secretan ciclofilinas en respuesta a la estimulación por lipopolisacáridos y que la citoquina IL-8, es una variante de las ciclofilinas.

Ahondando en la implicación de la información generada, las ciclofilinas son también, los mejores receptores de la ciclosporina A (de amplio uso farmacológico desde hace más de 20 años como droga inmunosupresora), pues forma complejos con las ciclofilinas que se unen e inhiben la calcineurina, lo que evita la activación de factores nucleares involucrados en la transcripción de genes que codifican varias citocinas incluyendo a la IL-2 y al interferón- gamma, previniendo la proliferación de las células T y por ende, inhibiendo las respuestas mediadas por ellas.

De ahí, se sugiere que las ciclofilinas pudieran ser secretadas por los tripanosomas para muchas funciones, una de ellas, sería durante el curso de una infección y contribuir a la modulación de las respuestas inmunes del hospedador mamífero.

Al mismo tiempo, se debe tener en cuenta en toda investigación con tripanosomas, que la variabilidad observada en diferentes estudios, no solo son responsabilidad del parásito, si no que el hospedador juega un papel preponderante en su capacidad de controlar o no la infección y/o el desencadenamiento de la enfermedad. (Authié *et al.*, 1993; Osório *et al.*, 2008).

En nuestro país se encuentran disponibles aún cierto número de medicamentos tripanocidas, pero sus precios son muy altos para ser absorbidos por sectores de pequeños y medianos



productores, de ahí que el desarrollo de métodos de diagnóstico de uso masivo, eficaces para el diagnóstico precoz de las infecciones en progreso y la vigilancia epidemiológica, orienta la medida inmediata de dirigir las investigaciones pecuarias hacia el desarrollo, validación y uso de estuches de diagnóstico para esta enfermedad que alcanza valores de seroprevalencia de hasta un 35% en promedio, solo en una zona agroecológica de un municipio del estado Guárico (Tamasaukas y Roa, 1991-1992), conociéndose las repercusiones negativas sobre los factores de la producción animal.

En tanto en un estudio posterior, Alfaro *et al.* (2008) en la caracterización sanitaria de sistemas bovinos doble propósito en los Llanos de Monagas de Venezuela, obtuvieron valores de prevalencia parasitológica de 5%, por observación de *T. vivax* en láminas coloreadas.

Las técnicas de ELISA, tanto la directa (Ag-ELISA) como la indirecta (Ac-ELISA) han sido evaluadas en varias partes del mundo, con el inconveniente de la variación en los resultados cuando se utilizan los protocolos en otros países.

Esta situación, se ha aludido a la 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; Cortez *et al.*, 2006).

En Venezuela, se requieren protocolos de *T. vivax* con metodologías de aseguramiento de la calidad así como con estándares probados en diferentes zonas geográficas del país, a fin de evaluar su desempeño en diversos niveles de prevalencia, virulencia y patogenicidad de las cepas, así como diferencias de tolerancia o susceptibilidad al parásito, entre otros factores. Siendo el de la tripanotolerancia, el más cercano a la variabilidad de resultados



entre autores y laboratorios, además del uso de diferentes fuentes de antígenos. (Tamasaukas y Florio, 2014).

La PCR como técnica molecular, posee características especiales que la hace útil en la identificación y diagnóstico debido a su especificidad, sensibilidad, versatilidad, rapidez y accesibilidad, ha permitido revelar infecciones en animales sintomáticos o asintomáticos sin parasitemia detectable (Dirie *et al.*, 1993). Es eficiente en la detección de un patógeno a nivel de género; caracterización de la especie, complejo o serotipo del organismo presente en una muestra determinada y en la identificación individual de un organismo. (Áñez *et al.*, 2007).

La PCR, implica una síntesis continua de ADN *in vitro* combinando en un tubo de ensayo una muestra de ADN problema, oligonucleótidos específicos (o *primers*), desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), una polimerasa (enzima Taq polimerasa) en un tampón apropiado (buffer y $MgCl_2$) para la elongación de los oligonucleótidos por la polimerasa. Este proceso consta de tres pasos, con temperaturas y tiempos diferentes repetidos sucesivamente que le permiten a la polimerasa actuar en una sucesión de ciclos sin inactivarse, los cuales se describen a continuación, acorde con lo señalado por Áñez *et al.* (2007) como premisas de un PCR.

1. Desnaturalización: En este paso el templado es sometido a altas temperaturas permitiendo la exposición de la secuencia de ADN blanco de amplificación.
2. Alineamiento: Durante esta etapa, la temperatura es disminuida con el fin de que los oligonucleótidos iniciadores (*primers*) reconozcan y se apareen con sus secuencias complementarias presentes en el blanco de la reacción, proporcionando un extremo hidroxilo 3' libre como sustrato para la enzima sintetizadora de ADN (ADN polimerasa).
3. Extensión, síntesis o elongación: En esta fase se formará una molécula de ADN por cada oligonucleótido apareado, cuya secuencia es idéntica a la del ADN blanco de amplificación.



Una vez seleccionada la fuente de ADN, la muestra debe ser sometida a un proceso de extracción de ácidos nucleicos con el fin de preservarlos y evitar la acción degradativa de enzimas u otros compuestos presentes en la misma, además de eliminar sustancias que interfieran o inhiban de alguna manera la reacción de amplificación. En general, los métodos de preparación de muestras buscan separar proteínas y extraer ADN. Las extracciones de ADN de todos los organismos guardan cierta similitud y consisten en romper las células para liberar su contenido y separar el ADN liberado del resto de los componentes celulares.

Una vez terminada la PCR, se realiza una técnica conocida como electroforesis horizontal en gel de agarosa para visualizar los millones de fragmentos de ADN de interés. Esta técnica consiste en armar un gel de agarosa, polisacárido ramificado de unidades D-galactosa y 3,6-anhidro-1-galactosa altamente hidrofóbico, con pequeños huecos en un extremo donde se deposita el contenido del tubo de PCR.

El gel es sometido a corriente eléctrica de modo que el ADN, una molécula cargada negativamente, se desplaza por el gel hacia el polo positivo. La matriz formada por la agarosa ofrece una resistencia al movimiento. De esta manera, las moléculas de mayor tamaño tendrán dificultad para pasar por los poros de la matriz, quedándose en la región superior del gel, mientras que los fragmentos de menor tamaño se movilizarán con facilidad, alcanzando su parte inferior.

Dependiendo de la concentración de agarosa, la matriz formada permitirá la separación efectiva de diferentes tamaños de ADN. Una vez concluida la electroforesis, se agrega al gel bromuro de etidio, colorante que se intercala entre las bases del ADN y permite visualizarlo al ser iluminado con luz ultravioleta (UV). Las bandas luminosas corresponden a los fragmentos de ADN amplificados. (Áñez *et al*, 2007).



La detección de infecciones subclínicas por *T. vivax* en Venezuela en un 2,8% de positividad en rebaños bovinos del estado Mérida, se han podido evaluar por métodos parasitológicos (examen microscópico de muestra fresca, microcapilar o Woo y láminas coloreadas), bioquímicos (Western blot) y moleculares (PCR). (Bolívar *et al.*, 2006).

Bolívar *et al.* (2007) describen una metodología basada en el fraccionamiento de las formas sanguíneas de *T. vivax* y *T. evansi*, la cual permitió la obtención de proteínas inmunogénicas capaces de diferenciar infecciones entre ambos parásitos, además de reconocer su capacidad antigénica especie-específica, lo cual puede servir de apoyo para la obtención de un método de diagnóstico diferencial en regiones donde circulan ambos hemoparásitos.

Otra estrategia de control de la tripanosomosis es la de 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., hecho 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).

Con la caracterización biomolecular de aislados 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 filogénicos del *T. vivax* (Reifenberg *et al.*, 1997) y derivar los estuches de diagnóstico con las diversas cepas circulantes 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.

Repetibilidad y Reproducibilidad de Resultados en Ensayos de Medición:



Como método de control de calidad, Llamosa *et al.* (2007) refieren, entre los requisitos técnicos de la Norma Técnica NTC-ISO/IEC 17025 “Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayos y calibración”, establece en el numeral 5.9 “Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración”, que todo laboratorio de calibración/ensayo debe tener procedimientos de control de la calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos y las calibraciones llevados a cabo, uno de estos métodos es el estudio de Repetibilidad y Reproducibilidad.

Repetibilidad de los resultados de las mediciones: Cercanía entre los resultados de mediciones sucesivas de la misma magnitud por medir, efectuadas en las mismas condiciones de medición. Estas condiciones se llaman condiciones de repetibilidad.

Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento de medición, el mismo observador, el mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones, el mismo lugar y repetición dentro de un período de tiempo corto.

La repetibilidad se puede expresar en forma cuantitativa, en función de las características de dispersión de los resultados.

Reproducibilidad de los resultados de mediciones: Cercanía entre los resultados de las mediciones de la misma magnitud por medir, efectuada bajo condiciones de medición diferentes. Para que una expresión de la reproducibilidad sea válida, es necesario especificar las condiciones que cambian.

Las condiciones que cambian pueden ser entre otras: el principio de medición, el método de medición, el observador, el instrumento de medición, el patrón de referencia, el lugar, las condiciones de uso y el tiempo.

La reproducibilidad se puede expresar en forma cuantitativa, en función de las características de dispersión de los resultados. Los resultados considerados aquí son generalmente los resultados corregidos.



Para realizar el estudio de Repetibilidad y Reproducibilidad, existen tres métodos: Rango, Promedio y Rango y ANOVA (análisis de varianza) los cuales cuantifican de diferente forma la variabilidad del sistema de medición, su implementación depende del tipo de actividad que se lleve a cabo en el laboratorio. La alta variabilidad antigénica de los tripanosomas, indican la necesidad de evaluar diversos productos antigénicos especie-específicos que coadyuven a mejorar la especificidad de la técnica de ELISA u otro método de diagnóstico, tal como las tiras reactivas, IFI entre otras. (Pillay *et al.*, 2013).

El presente trabajo resulta de la evaluación del desempeño en campo de un protocolo de Ac-ELISA utilizando como fuente de antígeno, tres productos antigénicos, de un aislado de *Trypanosoma vivax* del estado Guárico, para su aplicación en el diagnóstico por ELISA de la tripanosomosis bovina, con estudios epidemiológicos para la validación en campo.

3. PROBLEMA CIENTÍFICO

Objetivo General

Evaluar productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para su aplicación en las técnicas de ELISA en el diagnóstico de la tripanosomosis bovina con actualización del estudio epidemiológico de la enfermedad.

Objetivos específicos

1. Diagnosticar la situación actual de la tripanosomosis bovina en estados representativos de los Llanos Centrales de Venezuela.
2. Evaluar tres productos antigénicos especie-específicos de *T. vivax*, para su utilización en el desarrollo de protocolos de ELISA indirecto para el diagnóstico eficaz de la tripanosomosis bovina.

4. HIPÓTESIS



«En la tripanosomosis bovina, por ser endémica en la República Bolivariana de Venezuela, la utilización de productos antigénicos, obtenidos de *Trypanosoma vivax* de cepas de campo autóctonas, aplicados en un protocolo de ELISA indirecto validado, daría resultados confiables para el diagnóstico de la infección, en rebaños bovinos doble propósito y se presentarían muy pocas reacciones cruzadas con otros hemotrópicos tripanosomatídeos»

Ho = Sensibilidad > 95% - Especificidad > 90% - FP y FN < 5%

Ha = Sensibilidad < 95% - Especificidad < 90% - FP y FN > 5%

METODOLOGÍA

Materiales y Métodos

Zona Geográfica

Para el muestreo inicial, selección del aislado de *T. vivax* se muestrearon cinco (05) estados de la región de los Llanos Centrocidentales de la República Bolivariana de Venezuela, en los Municipios (13): Girardot y Camatagua del estado Aragua; Biruaca y Páez del estado Apure; Arismendi y Pedraza del estado Barinas; Pao del estado Cojedes, San José de Guaribe, Francisco de Miranda, Las Mercedes de Llano, Julián Mellado, José Félix Ribas y Santa María de Ipire del estado Guárico.

Así mismo, en una segunda fase de validación de la eficacia del extracto antigénico seleccionado para el ELISA, se realizó muestreo en dos (02) estados del eje centro-llanero, en los Municipios San Sebastián de Los Reyes y Camatagua, del Sur del estado Aragua y en los Municipios Mellado, Miranda, Las Mercedes del Llano, San José de Guaribe, Ribas y Santa María de Ipire del estado Guárico; zonas geográficas y agroecológicas representativas de la Altiplanicie de los Llanos Centrales de Venezuela.

Fincas de Muestreo



Fueron seleccionadas fincas que poseían ganado bovino doble propósito, puro y mestizo, ubicadas en las regiones señaladas.

Para la primera fase, se trabajaron 20 fincas, localizadas en los estados Apure (03), Aragua (02), Barinas (02), Cojedes (01) y Guárico (12).

En la segunda fase, se incorporaron tres (03) fincas ubicadas el sector de Valle de La Cruz, Municipio San Sebastián de Los Reyes, y tres (03) fincas del sector Carmen de Cura municipio Camatagua del estado Aragua (Región correspondiente a los Llanos Centrales del sur del estado Aragua).

Mientras que en el estado Guárico se muestrearon tres (03) en el Municipio Mellado, dos fincas (02) en el Municipio Francisco de Miranda, una (01) en el Municipio Las Mercedes del Llano, tres (03) fincas en el Municipio San José de Guaribe, dos (02) en el Municipio Ribas y una (01) en el Municipio Santa María de Ipire.

Descripción de las Zonas Geográficas de Estudio.

La Altiplanicie de los Llanos Centrales de Venezuela, se ha descrito como antiguos aplanamientos que por procesos geológicos, ciertas áreas han adquirido un relieve ondulado o en las que se han producido inversiones de relieve. En ella se distinguen tres Mesas: Mesa conservada (relieve suavemente ondulado con pendiente de 2 a 3%), Mesa disectada y/o altiplanicie de denudación (topografía suavemente ondulada a colinosa con pendiente de 3 a 20%) y la Mesa baja o inundable (zonas muy planas con pendientes inferiores al 2%). En total la altiplanicie de los llanos centrales es de 567.031 has, lo cual representa el 33,87% (MARNR, 1979; Gómez *et al.*, 1982; Espinoza *et al.*, 2006)

El norte del estado Guárico se caracteriza por presentar suelos de los órdenes Alfisoles, Ultisoles y Vertisoles, con pH ácido (promedio de 4,5), contenido de materia orgánica baja (3,19% de promedio), así como bajas concentraciones de los minerales fósforo, potasio, calcio y sodio, confirmando la baja fertilidad de estos suelos, donde presentan en promedio un 68% de arcilla, 10% de arena y el resto de limo (Mogollón y Comerma, 1994).



El clima es el típico llanero con períodos seco y lluvioso bien definidos (Arias y Riviera, 1978) y sus transiciones, ubicándose en la zona de vida del bosque seco tropical, con temperatura promedio que varía entre 22 y 29°C y precipitación entre 1000 y 1800mm anuales (Ewell, 1968). De acuerdo con Arias y Riviera (1978) la humedad relativa varía entre 65 y 82%.

En tanto, el sur del estado Aragua comprende una superficie aproximada de 385.376 hectáreas, las cuales representan el área más económicamente deprimida del estado. Se caracteriza por presentar un bajo nivel de vida, deterioro progresivo de sus suelos, agricultura de tipo extensiva y desasistida casi en su totalidad, constituyendo el medio de vida de sus pobladores (SITVEN-PALMAVEN, 1995), por lo que la calidad de vida de sus habitantes es extremadamente baja.

Estas áreas del sur comprenden a los municipios San Sebastián, San Casimiro, Camatagua y Urdaneta ubicados en el piedemonte meridional de la serranía del interior y en los llanos altos o planicie aluvial, entre los 10°33' – 9°15' de latitud norte y los 66°30' – 67°53' de longitud oeste.

El estado Guárico es considerada la puerta de entrada a los Llanos Centrales, ocupa la región de los llanos del centro de la República Bolivariana de Venezuela y toma su nombre del río principal que está ubicado a lo largo de su territorio. Su geografía norte está formada por una franja montañosa, el resto está ocupado por los llanos que llegan hasta el sur y se encuentra con el río Orinoco. Presenta una superficie de 64.986 km² que corresponde al 7,1% del territorio nacional.

La división político-territorial deviene en 15 municipios, los cuales se agrupan en tres ejes territoriales. Eje Norte (con cinco municipios: Roscio, Mellado, Ortíz, Monagas y San José de Guaribe), Sur-occidente con tres municipios (Miranda, Camaguán y Guayabal) y Sur-



oriente con siete municipios (Chaguaramas, Las Mercedes del Llano, Infante, Ribas, El Socorro, Santa María de Ipire y Zaraza.

Los llanos occidentales, que corresponden a los estados Apure, Barinas y Portuguesa y se dividen en llanos bajos y altos. Los llanos bajos, básicamente debajo de los 100 metros de altura sobre el nivel del mar, se inundan durante la época de lluvias (invierno) y tienen muchos ríos paralelos entre sí y que cambian de curso frecuentemente por acción de las dunas (montañas de arena) que son movidas por los vientos durante la sequía (verano). Los llanos altos se encuentran al pie de los Andes y son unas tierras muy ricas para el cultivo.

Los llanos centrales, que corresponden al Sur del estado Aragua, los estados Cojedes y Guárico. Tienen en la mitad del norte una serie de pequeñas montañas llamadas galeras. Aquí los ríos son menos abundantes y caudalosos que los que vienen de los Andes.

Aspectos Bio-Éticos

Todos los procedimientos en animales, tanto experimentales de campo como de laboratorio se realizaron bajo los principios de seguridad y confort, así como ejecutados por personal profesional y técnico capacitado para cada finalidad. Además de las contenidos en las Normas Internacionales y Código de Bioética de la Investigación con Animales.

Declaración de No Conflicto de Intereses

No existe ninguna situación de conflicto de intereses real, potencial o evidente, incluyendo ningún interés financiero o de otro tipo en, y/u otra relación con un tercero, que afecte el presente trabajo, aunque haya sido cofinanciado por el FONACIT, bajo las condiciones contractuales asumidas por las partes.

Derechos de Autor

Los derechos de autor del presente trabajo de tesis doctoral pertenecen a mi autoría, bajo las condiciones contractuales asumidas por las partes para la protección intelectual (autora y FONACIT).



Tamaño de la muestra experimental de animales de campo

Para las determinaciones de Prevalencia y Seroprevalencia (un muestreo en época seca y un muestreo en época de lluvias).

El número de animales a muestrear se determinará según el método descrito por la Organización Panamericana de la Salud (1973) y Duno (1992) asumiendo una prevalencia crítica para la tripanosomosis bovina de 16,66% para el estado Aragua y de 24,03% para el estado Guárico según valores obtenidos en el estudio de Agudo *et al.* (2009), con un margen de error con respecto a la prevalencia del 5% y un nivel de confianza del 95%, utilizando la siguiente fórmula para el cálculo del tamaño de la muestra:

$$n = \frac{Z^2 \times p \times q}{D^2}$$

de donde:

n = tamaño de la muestra

Z^2 = nivel de confianza 95% (1,96)

p= prevalencia estimada

q= 1-p

D^2 = margen de error

Para la primera fase, el tamaño de la muestra fue 790 animales, distribuidos al azar en las 20 fincas bajo ensayo, en las épocas de entrada de lluvias y lluviosa, bajo un modelo aleatorio estratificado (Agudelo *et al.*, 1984; García *et al.*, 1992).

Para la segunda fase, el tamaño de la muestra fue 213 animales en Aragua y 280 en Guárico, distribuidos al azar en los predios a estudiar, en ambas épocas (seca y lluvias).

Los animales se distribuyeron al azar en los tres grupos etarios que se conformaron: 0-12 meses de edad (grupo 1); 13-24 meses de edad (grupo 2) y 25 y más meses de edad (grupo 3), machos y hembras, bajo un modelo aleatorio estratificado (Agudelo *et al.*, 1984).

Animales Experimentales

En el estado Aragua, la muestra analizada fue de 220 bovinos doble propósito, incluyendo hembras y machos, de los tres grupos etarios, distribuidos al azar en cada rebaño. (Figura 1); mientras que para el estado Guárico, se analizaron muestras de 527 bovinos doble propósito, incluyendo hembras y machos, de los tres grupos etarios, distribuidos al azar en cada rebaño. (Figuras 1 y 2). El muestreo incrementó el número de animales:

- ✓ a solicitud de los propietarios para diagnóstico de eventos sanitarios
- ✓ para la validación del desempeño del Ac-ELISA homólogo con el extracto antigénico seleccionado
- ✓ necesidades de acompañamiento técnico

Figura 1. Animales experimentales, contenidos en el corral, preparándose para el muestreo y revisión clínica. Lugar Finca La Laguna, Carmen de Cura, Municipio Camatagua, estado Aragua.



Fuente: Propia



Fuente: Propia

Figura 2. Animales experimentales, preparándose para el muestreo y revisión clínica.

Guárico



Fuente: Propia

Diagnóstico Participativo

Se realizaron dos encuentros con productores y productoras de las zonas bajo estudios y se les aplicó encuesta técnica y epidemiológica diseñada y validada para tal fin. De igual



manera la evaluación clínica y muestreos de animales de las fincas seleccionadas se realizaron en conjunto con los productores y productoras para que participaran y recibieran formación.

Caracterización Racial

Se realizó en base a evaluación fenotípica. El grupo racial se estableció en función de la raza predominante, identificando mestizos Holstein (MH), mestizos Pardo Suizo (MPS), mestizos Cebuínos (MC), F1 *Bos taurus* – *Bos indicus*, Cebuínos comerciales, entre otros. (Figura 3). (Tamasaukas *et al.*, 2014a; b).

Figura 3. Composición Racial de Rebaños Bovinos en Predios bajo estudio. (Fuente: Propia)



Estado Guárico



Estado Guárico



Estado Guárico

Evaluación Clínica

Por la aplicación de la ficha clínica se realizó evaluación de los principales marcadores fenotípicos: color de las mucosas (normal, clara, pálida, según García *et al.*, 2005), tiempo



de perfusión (el cual se define como el tiempo de llenado capilar transcurrido luego de la presión ejercida por el dedo en la mucosa gingival), condición corporal (1 – 5, según cantidad de costillas visibles, siendo 1 todas las costillas visibles y 5 ninguna, se consideró a 2,5 como el punto de inflexión, de acuerdo a lo señalado por Martínez *et al.* (1998), presencia de vectores (*Tabanus spp.*, moscas, garrapatas), pesaje con romana o cinta pesadora, anotación de estado fisiológico. (Figuras 4, 5, 6 y 7).

Figura 4. Diagnóstico Clínico. Lugar Finca La Laguna, Carmen de Cura, Municipio Camatagua, estado Aragua. 2013



Fuente: Propia

Figura 5. Evaluación de mucosa gingival



Fuente: Propia

Figura 6. Pesaje con romana de animales de los grupos experimentales



Fuente: Propia

Figura 7. Pesaje con cinta pesadora de animales de los grupos experimentales



Fuente: Propia

Toma de Muestras

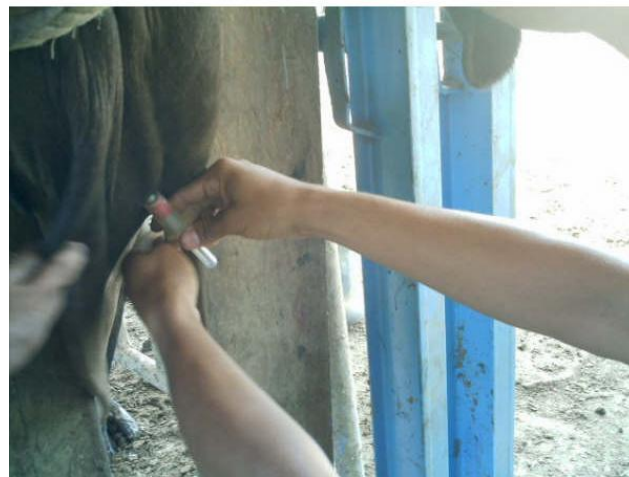
Los animales muestreados según el protocolo validado por Agudo *et al.* (2009) fueron sangrados vía yugular, tomando dos muestras de sangre por animal, en tubos Vacutainer, de 10 ml de capacidad, uno con anticoagulante y otro sin anticoagulante. Asignándoles un código de identificación y manteniéndolos en frío hasta su procesamiento posterior en el laboratorio. (Figuras 8 y 9).

Figura 8. Preparación para toma de muestras en campo.



Fuente: Propia

Figura 9. Toma de muestras de sangre en campo a los animales



Fuente: Propia

Valores Hemáticos

La determinación de hematocrito (Hto) y Hemoglobina (Hb) se realizó a través de la técnica directa en analizador hemático en tubos QBC Idexx®. (Tamasaukas *et al.*, 2006). (Figura 10). Estos valores de hematocrito y hemoglobina se realizaron para la fase 2 en el diagnóstico participativo de productores en Aragua y Guárico, así como para caracterizar los animales infectados o no por *T. vivax*, así como reforzar la valoración del Ac ELISA *T. vivax* con los extractos antigénicos especie-específicos validados en la fase 1.

Figura 10. Procesamiento de las Muestras para los análisis Hematológicos y de Hemotrópicos. QBC Idexx®. LABIPRESAN, San Juan de los Morros. Estado Guárico.



Fuente: Propia

Diagnóstico Parasitológico

Para la selección del aislado de *T. vivax*, se determinó la prevalencia de infecciones activas en frotis coloreados con Giemsa al 10% de capa blanca (FCB) y/o por tubos QBC Idexx® vistos en microscopio de fluorescencia. (Tamasaukas *et al.*, 2006).

Diagnóstico Serológico



Luego de la obtención de suero, se realizaron las técnicas de IFI y Ac-ELISA homóloga, con tres productos antigénicos especie-específicos de *T. vivax* a fin de determinar seroprevalencia y evaluar el comportamiento de cada extracto antigénico. El ensayo con Ac ELISA heteróloga, con una alícuota de cada muestra, fue realizada en el IVIC, bajo protocolo estandarizado.

Material Parasitológico

Designación de los materiales parasitológicos: a objeto de clarificar la nomenclatura sobre los diferentes materiales parasitarios que se utilizaron en el presente trabajo, se tomaron como base, las definiciones señaladas por Lumsden (1977) y lo revisado por Cortez *et al.* (2006).

Términos Generales:

- Población
- Muestra.
- Aislado Primario.
- Stock.
- Línea.
- Estabilizado.
- Clon.

Designación de Materiales Parasitológicos:

- Designación del Aislado Primario.
- Localidad en donde se obtuvo el Aislado Primario
- Año del Aislamiento: dos números arábigos.
- Código del Laboratorio que realiza el Aislamiento
- El Número Secuencial del Aislado en Específico.
- Cada uno de estos cuatro componentes estará separado del siguiente por el símbolo "slash: /", ejemplo: SERENGETI/58/EATRO/1716.
- Designación de Materiales Derivados



- Colocación del Nombre de la Especie o Sub-especie

Términos que impliquen caracterización:

- Términos relacionados a la Taxonomía:
 - Especies: cantidad de organismos que puedan ser distinguidos de otras especies por uno o más caracteres morfológicos estables y discontinuos. (Figura 11).
- Términos no relacionados a la Taxonomía:
 - Cepa.
 - Tipo de Variable o Variante Antigénico (VAT's). Éstos han sido descritos por Gray en 1965 (citado por Lumsden, 1977).
 - VAT de Referencia.
 - Repertorio de VATs.

Figura 11. *Trypanosoma vivax* en Frotis de sangre completa coloreado con Giemsa al 10% (100x Contraste de Fase)



Fuente: Propia

Parásitos

Para la elaboración de los extractos antigénicos especie-específicos, se utilizó un aislado de *T. vivax*, el cual se obtuvo a partir de las muestras de campo positivas al parásito en fincas del estado Guárico (Figura 11), identificado el aislado por PCR y caracteres fenotípicos: morfología, biometría y nivel de parasitemia del parásito; valores hemáticos de hematocrito y hemoglobina y color de las mucosas en los bovinos muestreados. El aislado además fue



seleccionado en base a los valores de prevalencia y seroprevalencia encontrados en el estado, a fin de caracterizar zonas de baja, media y alta prevalencia (seroprevalencia) en el mayor número de muestras posibles, en base a estudios referenciales.

Determinación de Parasitemia

Para la estimación de la parasitemia, se utilizó la técnica de Paris *et al.* (1982) la cual se basa en el conteo de los tripanosomas observados en 200 campos microscópicos en un frotis coloreado con Giemsa al 10%. (Tabla I).

Tabla I.- Estimación de la Parasitemia de Infecciones por *Trypanosoma* spp.

INDICE	<i>Trypanosoma</i> /CAMPO	PARASITEMIA (<i>Trypanosoma</i> /ml)
6	más de 10	$> 5 \times 10^6$
5	10	5×10^6
4	1 a < 10	$5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$
3	1 en 2 campos	$5 \times 10^3 - 5 \times 10^4$
2	1 - 10 por preparación	$> 10^3$
1	1 por preparación	$10^2 - < 10^3$

Fuente: Parris *et al.* (1982) Modificada por Tamasaukas, 2015.

Animales Experimentales de Laboratorio

Animales rumiantes donadores de antígenos (*Trypanosoma vivax*): Se dispuso, como donadores, para las infecciones experimentales, animales (bovinos o ovinos) puros o mestizos, jóvenes, sanos, clínica-, parasitológica- y serológicamente negativos a *Trypanosoma vivax*, *T. theileri*, *T. evansi* y otros hematozoarios (*Babesia* spp., *Anaplasma marginale*), utilizando para ello las técnicas de:

- Diagnóstico clínico-patológico: observación clínica, determinación del hematocrito por la técnica del microhematocrito o de Woo (1970) modificado por Toro *et al.* (1979; 1983) y Desquesnes (2004).
- Diagnóstico parasitológico: por las técnicas de Woo modificado (Toro *et al.*, 1979; Espinoza, 1990; Quispe *et al.*, 2003), Doble Centrifugación (Very *et al.*, 1990;



Quispe *et al.*, 2003) y QBC (Tamasaukas y González; 1994; Tamasaukas, 1995;a; b; Quispe *et al.*, 2003; Desquesnes, 2004).

- Diagnóstico serológico: por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (Espinoza, 1990; Tamasaukas, 1992a; b; 1995; a; b; Desquesnes, 2004).

Para la amplificación del aislado de *T. vivax* seleccionado como donador de extractos antigénicos especie-específicos fue utilizado un bovino joven, libre de patógenos y de hemotrópicos; en tanto que las amplificaciones subsiguientes se realizó con ovinos, libres de patógenos y de hemotrópicos, obtenidos de zonas geográficas libres de tripanosomosis (el bovino provino de la Estación Experimental Santa María de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela y los ovinos del Centro de Producción con Rumiantes de la UNERG).

Los animales fueron alojados en jaulas con suministro de alimentos y agua ad libitum, bajo condiciones de aislamiento y control de vectores.

Se inocularon por vía intra-venosa (en la vena yugular, Kaaya *et al.*, 1979) con la muestra o aislado primario, estabilizados, (según el caso) de *T. vivax* diluidos en solución buffer fosfato salina, a una dosis final de 100.000 *T. vivax* (Rae y Luckins, 1984), 600.000 (Moloo *et al.*, 1973) a 1.000.000-10.000.000 (Clarkson y Awan, 1969; Nantulya *et al.*, 1984) parásitos/animal en ovinos y en bovinos, de 100.000 a 1.000.000 parásitos/animal (Kaaya *et al.*, 1979).

Los animales inoculados con el aislado de *T. vivax*, fueron examinados dos veces al día (mañana, am y tarde, pm) hasta observar los parásitos y determinar la parasitemia (Moloo *et al.*, 1973) y colectar la sangre en el primer pico de la parasitemia, para obtener la primera población de parásitos (entre el día 6 y 8 post-inoculación (Jones y Clarkson, 1972; Kaaya *et al.*, 1979) y usarlos como antígenos, para la preparación de los estabilizados, como inóculo para la obtención de antisueros (Dar y Paris, 1973; Kaaya *et al.*, 1979) y en la preparación de los productos antigénicos de *T. vivax* para su aplicación en los protocolos de ELISA.



Para la obtención de productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax*: se revisaron las pautas metodológicas y modificadas de autores (Gardiner *et al.*, 1980; Masake y Nantulya, 1992; Nantulya *et al.*, 1992; Masake y Minja, 1995; Masake *et al.*, 1995; 1997; Mattioli y Faye, 1996; Meivernne, 1996; Eisler *et al.*, 1998; FAO/IAEA; 1998; Jacobson, 1998; Rebeski *et al.*, 1999; 2000; Magona *et al.*, 2002; OIE, 2004; Uzcanga *et al.*, 2002; Desquesnes, 2004; Bolívar *et al.*, 2007; Madruga *et al.*, 2006; Ouma *et al.*, 2007; Pillay *et al.*, 2013).

Partiendo de las bases metodológicas de los trabajos de los autores antes mencionados, se utilizaron tres productos antigénicos de *T. vivax*: extracto crudo total, extracto soluble citosólico purificado fraccionado y extracto antigénico desnaturalizado; derivados de tripanosomas metacíclicos, del aislado, estabilizados; para formatos o soporte ELISA en suero sanguíneo. Para el presente trabajo se evaluó el desempeño en campo de formatos de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos anti-*T.vivax*.

El antígeno estándar para las pruebas de anticuerpos de tripanosomosis se deriva de tripanosomas tomados del torrente circulatorio el animal. Para su preparación se partió de una parasitemia no menor de 2×10^7 trips/ml de sangre y se procesó la sangre para la purificación de los parásitos por las técnicas antes descritas.

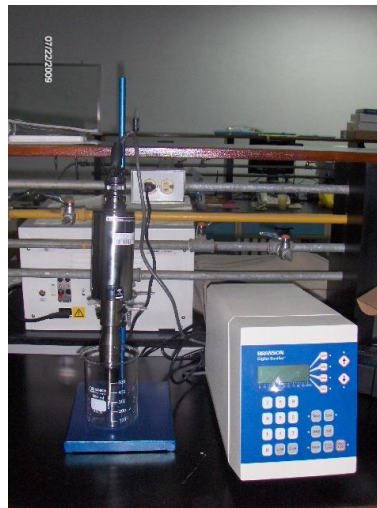
Los extractos crudos totales se obtuvieron a partir de la manera siguiente: se inocularon bovinos no expuestos a *T. vivax*, con el aislado de *T. vivax*, al momento del pico de la parasitemia, se colectó la sangre en tubos con anticoagulante.

La sangre con anticoagulante se procesó por la técnica de aislamiento y concentración por columnas de intercambio aniónico de DEAE-celulosa previamente tratada con un gradiente de Percoll y los parásitos eluidos fueron lavados dos veces en PBS pH 7,4, se centrifugaron a 800g por 10 min, se resuspendieron en PBS a una concentración de 4.000.000



tripanosomas/ml y fueron sometidas al proceso de sonicación con un procesador de células ultrasónico de amplitud máxima de 45s. (Figura 12)

Figura 12. Procesador ultrasónico de células (sonicador)



Fuente: Propia

Técnicas de aislamiento y concentración de tripanosomas salivarios mediante columnas de intercambio aniónico de DEAE-celulosa previamente separados por gradiente de Percoll

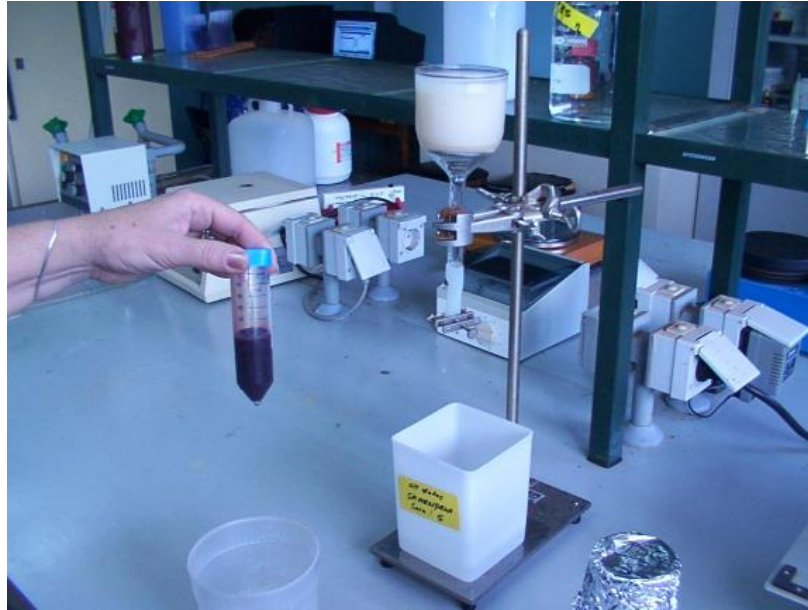
Bajo campana de flujo laminar, la sangre colectada en tubos Vacutainer con anticoagulante (EDTA), del ovino y/o bovino, infectada, con *T. vivax* (Figura 13), fue mezclada inmediatamente con igual volumen de la solución de Percoll (8,55 g de sucrosa, 2 g de glucosa, 100ml 100% de Percoll de densidad 1,130/ml), ajustar a pH 7,4 con la adición de HEPES sólido; la concentración final de Percoll fue de 50% en el buffer isotónico de sucrosa (usando 60% de buffer isotónico salino básico, ejemplo, medio de cultivo). (Grab y Bwayo, 1982; Luckins, 1987; González *et al.*, 2005) y Gradiente de Percoll (Grab y Bwayo, 1982): (Figura 14).

Figura 13. *Trypanosoma vivax* (flecha indicadora) en fresco observado a 100X contraste de fase



Fuente: Propia

Figura 14. Sangre completa de la sangría de los animales inoculados



Fuente: Propia

Después de la mezcla, con la suspensión de sangre más solución de Percoll se llenó en un 80%, los tubos de centrifuga y se centrifugaron durante 15 a 20 min a 17.500 xg (4°C). Bajo estas condiciones los tripanosomas se concentran usualmente en una banda cercana a la parte superior del gradiente, bien separada del bloque que se forma de los glóbulos rojos en el sedimento.

Aislamiento por columnas de intercambio aniónico con columnas de DEAE-celulosa (Lanham y Godfrey, 1970; Luckins, 1987): Preparación de la solución de elución: Se utilizó un tampón de fosfato salino glucosado (FSG) pH 8,0. Se preparó una solución Stock de fosfato salino pH 8,0 (13,48 g de Na_2HPO_4 anhidro + 0,78 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 4,25 g de NaCl + 1.000 ml de agua destilada). Se preparó un FSG pH 8,0 a partir de la solución Stock de fosfato salino. Para la preparación del FSG a utilizar en la separación de los tripanosomas es importante tomar en cuenta la especie parasitaria y el hospedador, a saber, con un 60% de recuperación de parásitos en sangre de ovino y 80% en sangre de bovino.

Equilibrio de la columna de DEAE-celulosa: se equilibró la DEAE-celulosa con FSG pH 8,0. Empaque de la celulosa: se empacó la celulosa en base a la proporción de 9 ml de DEAE-celulosa por 3 ml de sangre diluida 1:3 con FSG frío. Para 9 ml de DEAE-celulosa



se utilizó una columna de 16 ml de altura y de 1,2 a 1,5 cm de diámetro. El tamaño de la columna varió de acuerdo al volumen de sangre a eluir. Para volúmenes de material a eluir de 50 a 100 μ l se utilizó una jeringa plástica de 2 ml de capacidad (Lumsden *et al.*, 1977).

Previo al empaque de la celulosa, se colocó en su parte inferior un trozo de lana de vidrio o papel filtro Whatman #41 para retener la resina. La columna se empacó con la resina con cuidado, de manera convencional con volúmenes sucesivos de DEAE-celulosa equilibrada a pH 8,0. Después de empacada la columna, se dejó pasar la solución de elución varias veces, controlando el pH. La salida del flujo se controló colocando una pinza de presión en la sonda de goma conectada en la parte inferior de la columna (jeringa). (Figura 15).

Figura 15. Preparación de la columna de DEAE-celulosa para separación de los parásitos



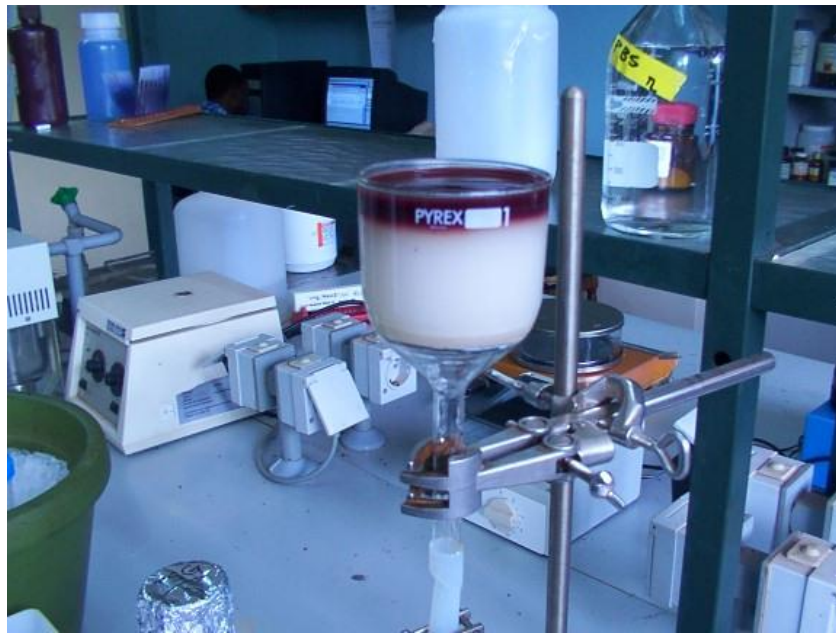
Fuente: Propia

Elución y Recolección del Eluido contenido de los tripanosomas: La muestra de sangre infectada, previamente tratada por el gradiente de Percoll como se describió anteriormente, se colocó cuidadosamente en la parte superior de la columna con una pipeta Pasteur larga,



esperando que entre toda a la resina, luego se añadió FSG pH 8,0 en forma continua. (Figura 16)

Figura 16. Columna de DEAE-Celulosa con sangre infectada por *T. vivax* para aislamiento y purificación



Fuente: Propia

Se colectó el volumen eluido en tubos mantenidos en un recipiente con hielo para garantizar la viabilidad de los parásitos eluidos. Se observó al microscopio muestras del eluido para evidenciar la elución y viabilidad de los parásitos. Se reunieron todos los eluidos y se lavaron con FSG dos a tres veces por centrifugación a 2.000 rpm durante 10 min cada vez para concentrar los tripanosomas aislados. (Figura 17 y 18)

Figura 17. *T. vivax* aislados y purificados



Fuente: Propia

Al terminar de separar los parásitos, se lavó varias veces la resina con agua destilada para eliminar los residuos. Se calculó el número de tripanosomas presentes en el eluido por conteo en cámara de Neubauer (De Gee *et al.*, 1979), verificando su viabilidad.

Se prepararon alícuotas para su criopreservación en nitrógeno líquido o para la dosificación de parásitos en caso de necesitarlos para inoculación inmediata de animales experimentales, según fuera el caso.

Técnica de Anticuerpos Policlonales anti-Trypanosoma vivax

Se utilizaron conejos de laboratorio, inoculándoles en múltiples sitios, los estabilizados de los aislados no clonados de *T. vivax* a una dosis 100.000.000 tripanosomas/ animal, los cuales se mezclaron con igual volumen de adyuvante completo de Freund para la primera inyección y con el incompleto para las subsiguientes inoculaciones.



Después de tres boosters inmunizantes (cada dos semanas uno), los conejos fueron sangrados por vía intra-cardíaca, previa eutanasia, y se separó el suero por centrifugación y se almacenó congelado en alícuotas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su posterior utilización (Nantulya *et al.*, 1992; Singh *et al.*, 1994 citados por Desquesnes, 1997; Desquesnes, 2004).

Para la separación de la fracción de inmunoglobulinas del antisuero anti-*T. vivax* preparado, se utilizó la técnica de precipitación con solución salina saturada de sulfato de amonio (50%); el precipitado se lavó dos veces con 50% de solución saturada de sulfato de amonio, disuelto en PBS pH 7,2 y luego dializada contra PBS a 4°C ; se calculó el contenido de proteína de los anticuerpos por fotometría y se mantuvieron congelados a -20°C , en alícuotas de 0,1 ml, hasta su utilización posterior (Rae y Luckins, 1984; Rurangirwa *et al.*, 1986; Luckins, 1987).

Sueros Controles y de Referencia

Para la realización de diversas técnicas se utilizaron sueros controles positivos titulados (débil, mediana y fuertemente positivos, Ac policlonales) y sueros negativos, mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, ELISA y PCR, provenientes de animales positivos (con parasitemia conocida, Ac policlonales) y negativos a las técnicas parasitológicas directas (por QBC y/o frotis coloreados de sangre completa y/o frotis coloreados de capa blanca). Los sueros controles de referencia fueron donados por el CIRDES, Burkina Faso, África Occidental.

Técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Se utilizó la técnica del antígeno fijado descrito por Nantulya y Doyle (1977), Nantulya *et al.* (1982; 1987), Katende *et al.* (1987). Espinoza (1990), Duno (1992), Tamasaukas (1992a), Tamasaukas y Roa (1991-1992), Tamasaukas *et al.* (1998; 2000; a; 2002; 2006; 2010; 2014).



Con esta técnica se estabilizan los antígenos de superficie de los tripanosomas, preservando las variables antigénicas para la IFI, sin que ocurra distorsión de la morfología de los parásitos.

La diferencia con la técnica convencional consiste básicamente en la preparación de los antígenos, de manera de fijar los tripanosomas viables, en una suspensión con 80% de acetona, para exponer los antígenos externos, y 0,25% de formalina para estabilizar y preservar los antígenos expuestos, eliminando así las adhesiones no específicas de los tripanosomas con lisado de linfocitos bovinos. La antigenicidad de los parásitos no se verá afectada por el proceso de fijación ni por el tiempo de almacenamiento.

Preparación de los antígenos: Los tripanosomas eluidos y purificados se lavaron tres veces con solución buffer fosfato salina glucosada pH 8,0 (PSG) en frío, asegurando su viabilidad con la tinción excluyente de Azul Trypan. Los parásitos fueron resuspendidos en solución fisiológica salina en frío hasta lograr una concentración final de 1.000.000 tripanosomas/ml.

Un volumen de la suspensión de los parásitos se añadió rápidamente a dos volúmenes de la solución fijadora en frío, 80% v/v de acetona + 0,25% v/v de formalina en solución salina, agitando suavemente. La suspensión de parásitos + solución fijadora se dejó reposar por 24 horas a -20°C . Después de la fijación, los tripanosomas se centrifugaron a 450 g por 15 min a 4°C , luego se lavaron por tres veces con solución salina fisiológica antes de resuspenderlos en PBS con 0,2% de azida-sódica y 0,2% de albúmina sérica bovina (BSA) hasta llegar a una concentración de 4.000.000 de tripanosomas/ml. Los parásitos así fijados se almacenaron a -60°C en alícuotas de 0,5 ml.

Preparación del lisado linfocitario bovino: Se utilizó un bovino de 4 meses de edad, esplenectomizado y mantenido bajo condiciones controladas en jaula con malla para control de vectores, por unas cuatro semanas, en una zona libre de hemotrópicos. Para excluir la posibilidad de una infección latente, se le tomaron muestras diarias de sangre y se



procesaron por técnicas parasitológicas (Woo, Doble Centrifugación, QBC, Frotis coloreados con Giemsa) por esas cuatro semanas. Luego se sacrificó y al momento de la necropsia se colectaron todos los ganglios linfáticos accesibles, se cortaron en pequeños trozos y se colocaron en frío en una solución buffer fosfato salina pH 7,2 con 0,45% de EDTA (ácido etilendiaminatetra-acético) como anticoagulante.

Las células se separaron del tejido y se tamizaron por un colador, lavándolas 3 veces con la solución PBS-EDTA y centrifugándolas a 200 g por 20 min a 4°C. Los linfocitos lavados resuspendidos en PBS sin EDTA hasta llegar a una concentración de 50.000.000 células/ml. Las células se procesaron por sonicación en alícuotas de 100 ml sobre hielo a intervalos de 1 min usando la sonda de 3/8. El material sonicado fue centrifugado a 400 g por 30 min a 4°C y el sobrenadante, conteniendo 5 mg de proteína/ml, almacenado a -70°C en alícuotas de 4 ml.

Se utilizó un conjugado de antisuero ovino-IgG bovinas-FITC comercial (Sigma).

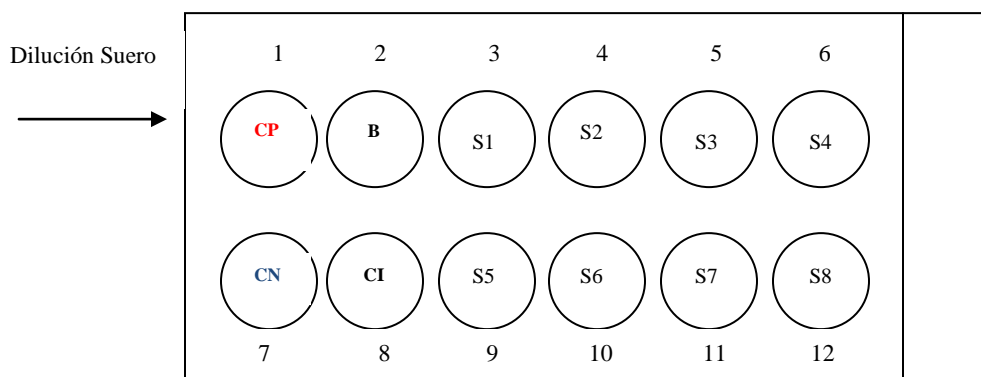
Ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI): Los tripanosomas fijados y congelados se descongelaron a temperatura ambiente, y se agitaron antes de colocarlos en las láminas porta-objetos. Se colocaron 200 μ l de los parásitos fijados en cada uno de los círculos de la lámina, y las láminas se dejaron secar a temperatura ambiente. La primera dilución del suero problema, así como de los sueros controles, positivo y negativo, se hicieron con el lisado linfocitario, para evitar las reacciones fluorescentes inespecíficas (Katende *et al.*, 1987). Las muestras diluidas fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min antes de transferirlas a las láminas con los antígenos adheridos o antes que la última dilución usando PBS + 0,2% de BSA.

Se colocaron 25 μ l de los sueros diluidos 1:80, a los círculos en las láminas-antígenos, se incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda por 30 min y luego se lavaron por 2 veces en PBS por inmersión y agitación suave, durante 15 min cada lavado. Dejar secar. Se



dispensaron 10 μ l del conjugado (previamente titulado para obtener la dilución óptima, a una dilución de 1:10.000) de IgG-antibovinas de ovinos-FITC en cada círculo de las láminas, incubaron a temperatura ambiente en cámara húmeda por 30 min, se lavaron 2 veces en PBS por inmersión y agitación suave, durante 15 min cada lavado, se montaron las láminas en una solución de 50% de glicerol en PBS pH 8,0 y examinaron en cuarto oscuro, en un microscopio binocular de luz ultravioleta (UV) (Zeiss, modelo Axioscop de contraste diferencial y lámpara Zeiss, HBO 50W de mercurio), bajo objetivo de inmersión de 100X, con los filtros correspondientes.

Figura 18: Distribución de los Sueros en IFI.



Leyenda: CP: Control Positivo; CN: Control negativo; B: Blanco (control reactivos);
CI: Suero Control Interno; S1 a S8: Sueros Problema 1 al 8

La fluorescencia en los controles positivos es clara, mientras que es ausente en el control negativo, de allí que se hace mucho más fácil la distinción entre un suero positivo y uno negativo, por el contraste tan marcado, aunque la lectura debe hacerse con rapidez para evitar que el fluorocromo pierda intensidad ante la acción de la luz UV.

Para la determinación de la positividad por IFI, de los sueros problemas, a *T. vivax*, se estableció el criterio subjetivo referenciado por Espinoza (1990) y aplicado por Tamasaukas (1992a, b), de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia observada; utilizándose la siguiente simbología:



- (-) = negativo
- (+) = positivo débil
- (+ +) = positivo moderado
- (+ + +) = franco positivo

Criopreservación de Parásitos y sus Productos

La técnica utilizada fue la de Espinoza y Tortolero (1990) modificada por Tamasaukas (1992a, b, 1995) con la modificación de Gómez-Piñeres *et al.* (2009), se preparó una solución buffer fosfato salino (BFS 0,02 M fosfato de sodio 0,15 M NaCl pH 7,2), se mezclaron 4 volúmenes de BFS y 6 volúmenes de agua destilada (4:6), el volumen medido de sangre infectada a congelar se mantuvo a temperatura ambiente. La mezcla del agente crioprotector fue del dimetilsulfóxido (DMSO) al 10% o glicerina a una solución patrón de 16%, con adición de 1% de glucosa, ambas en la solución preparada anteriormente.

La solución crioprotectora, se mezcló volumen a volumen con la sangre infectada, de modo que si se utilizaba DMSO la concentración final quedó al 5% y si era glicerina al 8%; seguidamente se envasó la sangre infectada con el crioprotector añadido, en recipientes de 3 ml, protegidos previamente con papel de aluminio, congelándose inmediatamente en nitrógeno líquido en fase gaseosa y luego al fondo del tanque a -196°C.

Técnica de Ac-ELISA heteróloga

Fue determinada seroprevalencia por medio del inmunoensayo enzimático ELISA indirecto (Ac-ELISA), con el apoyo del IVIC, bajo los siguientes parámetros:

- Antígeno de extracto soluble de *Trypanosoma evansi* a una concentración de 40µg por pozo, incubado por 24 horas.
- Solución de bloqueo de leche descremada al 5%, por 1 hora a 37°C.
- Dilución de suero (anticuerpo primario) de 1/200, incubado por 1 hora a 37°C.
- Concentración de conjugado 1/10.000 incubado por 1 hora a 37°C.
- Sustrato ABTS con incubación de 45 minutos a temperatura ambiente.
- La lectura se efectuó a 405 nm.



- Se consideraron sueros serológicamente positivos aquellos cuya D.O fuera mayor que la media más dos desviaciones estándares de 3 controles negativos.

Esta técnica fue la reportada como uso del laboratorio, en base al Proyecto de la Agenda de Biotecnología N° 26072, financiada por BID-FONACIT II. Red de Identificación y Diagnóstico Molecular de Hemoparásitos con Impacto Económico en el Sector Agropecuario. Instituciones participantes: UNESR, IVIC, USB, UNEFM, UCLA, LUZ. Responsable: Trina Perrone. 2005 – 2008. (<http://www.inmunobiologia.net.ve/oproyectos.html>).

Esta técnica fue utilizada para la determinación de seroprevalencia durante la fase de muestreo para aislamiento de *T. vivax* y se comparó con el Ac-ELISA homólogo.

Técnica de Ac ELISA homóloga: Se siguió el siguiente protocolo:

- Antígeno de extracto soluble de *Trypanosoma vivax* a una concentración de 40µg y 20 µg por pozo, incubada la placa por 24 horas.
- Diluidos 1:800 en buffer fosfato Dulbecco.
- Incubación por 2h a 37°C en cámara húmeda.
- En congelación a -20°C para su sensibilización por 12 a 14 horas.
- Lavado con PBS.
- Solución de bloqueo incubándose las placas a 4°C por 4 horas; posteriormente se dejaron en congelación por 12 a 14 horas a -20°C.
- Lavado con PBST.
- Los sueros controles de referencia (positivos y negativos fueron diluidos 1:1000 en PBST y colocados 100µl en cada pocillo, por duplicado (40µg y 20µg de Ag), incubados por 45 min a 37°C en cámara húmeda y lavadas con PBST.
- Conjugado de IgG anti-bovina-peroxidasa, diluido 1:10000 en PBST, 50µl en cada pocillo.



- Solución de sustrato (ABTS) manteniendo protegida de la luz las placas, y la reacción fue frenada a los 10 min por la adición de 100µl de H₂SO₄.
- La lectura se efectuó a 450 nm.
- El punto de corte fue considerado como el promedio de la Densidad Óptica (DO) de dichos sueros más dos desviaciones estándares.

Figura 19. Protocolo Placa Ac - ELISA *T. vivax* homóloga

PROTOCOLO Ac ELISA *Trypanosoma vivax* N° _____

FECHA: _____ PREDIO _____ UBICACIÓN _____ ESPECIE _____ OPERADOR(A) _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco	C+++	C+++	SP1	SP1	SP8	SP8	SP14	SP14	S+++	Blanco
B	Blanco	Blanco	C+++	C+++	SP1	SP1	SP9	SP9	SP15	SP15	S+++	Blanco
C	Blanco	Blanco	C++	C++	SP2	SP2	SP10	SP10	SP16	SP16	S++	Blanco
D	Blanco	Blanco	C++	C++	SP3	SP3	SP11	SP11	SP17	SP17	S++	Blanco
E	Blanco	Blanco	C+	C+	SP4	SP4	SP12	SP12	SP18	SP18	S+	Blanco
F	Blanco	Blanco	C+	C+	SP5	SP5	SP13	SP13	SP19	SP19	S+	Blanco
G	Blanco	Blanco	C-	C-	SP6	SP6	SP13	SP13	SP20	SP20	S-	Blanco
H	Blanco	Blanco	C-	C-	SP7	SP7	SP13	SP13	SP21	SP21	S-	Blanco

PLACA N° _____ N° LOTE Sueros Controles Referencia _____ N° LOTE Sueros + y - conocidos _____

Evaluación del Desempeño del ELISA homóloga

Fueron determinadas la Sensibilidad y la Especificidad con 100 sueros controles de referencia.

Determinación de algunas condiciones para optimizar proceso de obtención de extractos antigénicos de *T. vivax*:

- ❖ Concentración del extracto antigénico del *T. vivax*
- ❖ Temperatura y tiempo de sensibilización de las placas



- ❖ Dilución de los sueros: controles de referencia (+++, ++, +, -), problemas (muestras conocidas: FCG, QBC, IFI, otras)
- ❖ Tiempo y temperatura de incubación
- ❖ Soluciones de lavado
- ❖ Solución de Bloqueo
- ❖ Conjugado y Substrato
- ❖ Condiciones de revelado de las reacciones Ag-Ac
- ❖ Operador por Ensayo

Pruebas de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos

Se tomó la base sobre caracterización de pruebas diagnósticas para su validación, señalando que desde el punto de vista epidemiológico, la definición de los términos de sensibilidad y especificidad epidemiológica, dependerá básicamente de la sensibilidad inmunológica de la prueba en sí y de su variación relativa según el desempeño en condiciones de campo. La sensibilidad y especificidad diagnósticas son características de la realización de una prueba para una población estudiada. Ambas características determinan –en conjunción con la prevalencia de la enfermedad en la población- la probabilidad de que un resultado concreto de una prueba refleje el verdadero estado del animal. (OIE, 2008).

Puede aceptarse como validada una prueba si se dispone de estimaciones fiables de la sensibilidad y la especificidad diagnósticas para la población estudiada. Esto no implica la exigencia de unos determinados valores-umbral de esos dos parámetros.

En aplicaciones prácticas, unos valores de sensibilidad o especificidad bajos o problemas de diagnóstico debidos a una prevalencia baja de la enfermedad se compensan con el diseño de muestreo o combinando muchas pruebas de diagnóstico ya sea en paralelo, ya sea secuenciada. (OIE, 2008).



La selección de las pruebas, el proceso de muestreo, la combinación de múltiples pruebas en un determinado régimen de ensayo y la regla de interpretación de resultados hacen posible una definición del proceso de diagnóstico.

Así se tiene que, sensibilidad epidemiológica es el grado de certeza de una prueba para detectar los animales auténticamente positivos; mientras que la especificidad epidemiológica se define como el grado de discernimiento de los animales auténticamente negativos.

Ambos términos se expresan en valores porcentuales (%) sin existir, necesariamente, una relación directa entre ellos.

Tabla II. Tabla de contingencia de doble entrada para la validación de la prueba de Ac-ELISA *T. vivax* con la prueba de IFI-*T. vivax* para la misma muestra de sueros

RESULTADOS		IFI		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
Ac-ELISA	POSITIVO	a	b	a+b
	NEGATIVO	c	d	c+d
TOTAL		a+c	b+d	a+b+c+d

$$\% \text{ Sensibilidad} = a / a + c \times 100$$

$$\% \text{ Especificidad} = d / b + d \times 100$$

Fuente: Propia, adaptado de OIE, 2008.

La Tabla II presenta la tabla de contingencia de doble entrada y expresión matemática de los términos sensibilidad y especificidad epidemiológicas.

Mientras que el valor predictivo, para cada prueba, fue determinado de la siguiente manera:

- Valor Predictivo Positivo = Verdaderos Positivos / (Verdaderos Positivos + Falsos Positivos)



- Valor Predictivo Negativo = Verdaderos Negativos / (Verdaderos Negativos + Falsos Negativos)

Ensayos de Repetibilidad/Reproducibilidad

Como un principio de la estandarización de técnicas, la prueba ELISA tal como se describe en este trabajo, fue realizada en un serie de quince ensayos, cinco réplicas para cada uno de los tres extractos antigénicos (ensayos), sobre diferentes placas y en diferentes días, empleándose los sueros controles fuertemente positivos (media del pool de los mayores valores de D.O.), medianamente positivos (media de las D.O.), débiles positivos (media del pool de los menores valores de D.O.) y negativos.

El coeficiente de variación intra y entre ensayo fue determinado según Tijssen (1993) y Jacobson (1998) aceptándose como válidos valores de coeficientes de variación (CV) igual o menores al 10%.

Todos los ensayos fueron realizados bajo el mismo protocolo, equipos y fuentes de reactivos, las variables fueron tiempo entre ensayos y operadores entrenados. (Llamosa *et al.*, 2007).

Métodos Estadísticos

Se realizaron las pruebas estadísticas descriptivas, ANAVAR, prueba de medias de Tukey y tablas de contingencia 2x2 para sensibilidad, especificidad valor predictivo e índice de concordancia de *Kappa* (Ortíz-Losada *et al.*, 2007). Se determinó el porcentaje de concordancia con respecto a la prueba de referencia, lo cual se obtuvo con el número de sueros cuyos resultados fueron coincidentes con los de referencia en base a 50 o 100 sueros.

Este procedimiento permitió calcular el Índice *Kappa*, Con el fin de determinar hasta qué punto la concordancia observada es superior a la que es esperable obtener por puro azar. La máxima concordancia posible corresponde a $\kappa = 1$.



El valor $\kappa = 0$ se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar. (Steel & Torrie, 1980; Tamasaukas, 1995).

Determinación de la Prevalencia (Seroprevalencia) Relativa General

Los valores fueron determinados por la siguiente fórmula: (Tamasaukas, 1995a,b)

$$\text{PRG } T. \text{ vivax} = \frac{\text{No. muestras Positivas}}{\text{No. total muestras Procesadas}}$$

Determinación de la Prevalencia (Seroprevalencia) Relativa por Finca

Los valores fueron determinados por la siguiente fórmula: (Tamasaukas., 1995a,b)

$$\text{PRF.} = \frac{\text{No. muestras Positivas/ finca}}{\text{No. total muestras Procesadas}}$$

Determinación de la Prevalencia (Seroprevalencia) Relativa por Estado

Los valores fueron determinados por la siguiente fórmula: (Tamasaukas, 1995a,b)

$$\text{PRF.} = \frac{\text{No. Muestras Positivas/ estado}}{\text{No. Total de muestras procesadas}}$$

Fueron realizadas estadísticas descriptivas para todas las variables (promedio, desviación estándar, distribución de frecuencias para hematocrito y hemoglobina), métodos no-paramétricos (tablas de contingencia 2x2).

ANAVAR (hematocrito, hemoglobina), pruebas de Tukey (hematocrito, hemoglobina) para determinar diferencias significativas entre grupos, épocas, edad y sus interacciones, Correlación de Pearson para hematocrito, hemoglobina, peso, condición corporal), Correlación de Spearman al incorporar la variable edad; Fisher, Ji cuadrado y prueba de las proporciones para prevalencia y seroprevalencia.



Multivariados por análisis de componentes principales para la determinación de clases en función de los valores de hematocrito, CC, peso y color de las mucosas (Steel y Torrie, 1980; Tamasaukas y Roa, 1991-1992; Rowlands *et al.*, 1993; Tamasaukas *et al.*, 2014a; b; Colmenares, comunicación personal).

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 (QBC, ELISA e IFI); así como también una comparación entre el comportamiento del Ac-ELISA homóloga y la IFI (pruebas inmunológicas cuyo fundamento fue la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma vivax*.) mediante un análisis de Kruskal-Wallis, usando el paquete estadístico SAS (1998).

Por ser la primera vez que se desarrolla y utiliza un Ac-ELISA homólogo en la detección de tripanosomosis con extractos antigénicos de un aislado venezolano, se evaluó el comportamiento de dicho ensayo mediante la determinación de: sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, así como la razón de verosimilitud positiva y negativa, según lo establecido (Thrusfield, 2005).

Debido a que el Ac-ELISA homólogo 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 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).

Fue utilizado el EPIDAT vs 3.1 programa para análisis epidemiológico y estadístico desarrollado por la Dirección Xeral de Innovación e Xestión da Saúde Pública de la Consellería de Sanidade (Xunta de Galicia) con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS-OMS) y la Universidad CES de Colombia. (USALBIOMEDICA, 2014).



Reacción de la Polimerasa (PCR):

Fue utilizado el Protocolo de PCR para detección de *T. vivax* establecido por Bolívar (2003).

DetECCIÓN DE *T. vivax*

El ADN total fue extraído a partir del stock del aislado de *T. vivax* y extractos antigénicos de *T. vivax* utilizando el Kit Puregene DNA Purification System Kit (Qiagen, Dusseldorf, Germany) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se almacenó a -30°C hasta su uso. Se empleó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar la identificación de especie.

Se utilizó en la PCR para esta especie los cebadores (primers) TviSL1 (GCTCTCCAATCTTAACCCTA) y TviSL2 (GTTCCAGGCGTGCAAACGTC) descritos por Ventura *et al.* (2001). La mezcla de reacción se preparó para un volumen final de 25µl conteniendo 10X de buffer, 25mM de MgCl₂, 10mM de dNTP, 20µM de cada primer, 5U/µl de Taq polimerasa (Promega) y 5µl de ADN.

En tanto se utilizaron para los controles de tripanosomas africanos, se usaron los cebadores específicos ITS1BR/ITS2BR para *T. brucei*, ITS1CF/ITS2CF para *T. congolense forest* 700pb y ITS1CS/ITS2CS para *T. congolense savannah*, acorde a lo señalado por Thumbi (2008) para estas especies africanas de tripanosomas.

Electroforesis:

La electroforesis para los productos de PCR de *T. vivax* fue corrida sobre geles de agarosa al 2%, coloreados con bromuro de etidio y visualizados en transiluminador de luz ultravioleta (UV).

Controles de Reacción:

Para evaluar la especificidad de la reacción, fueron empleados controles positivos y negativos de referencia. Los controles positivos de *T. vivax* descritos, fueron cedidos por el



Laboratorio de Referencia del CIRDES, de Burkina Faso, África Occidental; mientras que los controles negativos estaban representados por agua de reacción y ADN de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense savannah* y *Trypanosoma congolense forest*, de origen africano, también donados por el CIRDES, en Burkina Faso, África Occidental.

5. RESULTADOS

Evaluación de Extractos Antigénicos de T. vivax:

Parásitos:

Para la producción de los extractos antigénicos especie-específicos, se utilizó un aislado del estado Guárico de *T. vivax*, los cuales se obtuvo a partir de las muestras de campo positivas al parásito (Figura 11) (caracterizado por PCR y caracteres fenotípicos), tal como descrito en la metodología.

El ovino fue inoculado por vía endovenosa en la vena yugular con la muestra o aislado primario, estabilizados de *T. vivax* diluidos en solución buffer fosfato salina, a una dosis final de 100.000 parásitos/animal.

El ovino inoculado fue alojado bajo las mismas condiciones del sitio de origen (Centro de Producción de Ovinos y Caprinos de la UNERG, zona libre de hemotrópicos e indemne a *Trypanosoma*), alimentado con pacas de heno y pasto fresco, adecuado a sus requerimientos nutricionales y con suministro de agua *ad libitum*.

El animal fue examinado dos veces al día (am y pm) hasta observar los parásitos, determinando la parasitemia, coleccionar la sangre en el primer pico de la parasitemia, para obtener la primera población de parásitos (entre el día 6 y 8 post-inoculación) y usados como antígenos, para la preparación de los estabilizados y como inóculo para la obtención de antisueros.

La inmunosupresión con dexametasona, droga linfocitotóxica e inhibidora de la función de los macrófagos y de los linfocitos, fue administrada a una dosis de 200 mg/Kg por vía intramuscular dos días antes y dos días después de la inoculación de los parásitos.



Al momento del primer pico de la parasitemia, el ovino fue sangrado por la vena yugular a fin de colectar con equipo Vacutainer al vacío, con anticoagulante (EDTA) la mayor cantidad de sangre infectada, colocados los tubos en bolsas plásticas selladas e identificadas en cava con hielo y transportadas de inmediato al laboratorio para su procesamiento.

Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 400 g por 15 min a 4°C. La capa de interfase glóbulos rojos/plasma (rica en tripanosomas) se recuperó por aspiración y se resuspendió en solución buffer fosfato salina glucosada (PSG) pH 8,0, obteniendo los parásitos por las técnicas de aislamiento en columnas de intercambio aniónico de DEAE-celulosa y concentración por gradiente de Percoll, para su utilización posterior, guardándolos criopreservados en concentración de 1.000.000 de tripanosomas/ml. El rendimiento del proceso de producción fue de 17 al 20%, considerándose bueno para esta especie parasitaria.

Posteriormente se procedió a la obtención del aislado primario, inoculando esas muestras en un bovino (becerro libre de patógenos) y ovinos (para posteriores amplificaciones), inmunosuprimidos, con dexametasona, para su amplificación y denominación del Stock de cepas de *T. vivax* aisladas de animales infectados del estado Guárico.

Designación de Materiales Parasitológicos: El aislado se denominó GUÁRICO/12/LABIPRESAN/001/*T.vivax*, acorde con lo establecido por Lumsden (1977) y lo revisado por Cortez *et al.* (2006). Los materiales subsiguientes fueron denominados como cepas de *T. vivax* del estado Guárico.

Preparación de Antígenos de *T. vivax*:

Los **extractos crudos totales**, se obtuvieron a partir de tripomastigotes de *T. vivax* de la manera siguiente: se inocularon bovinos no expuestos a *T. vivax*, con los aislados de *T. vivax*, al momento del pico de la parasitemia, se colectó la sangre en tubos con anticoagulante.



Para obtener **los extractos antigénicos solubles, citosólicos**, se prepararon parásitos de sangre entera de bovinos infectados por medio de intercambio aniónico en DEAE, lisados mediante ciclos de congelación–descongelación y por centrifugación a 10.000 g durante 30 minutos. Se centrifugaron a 25.000g por 30 min a 5°C, el sobrenadante se filtró (0,2 μ m), el pellet fue homogeneizado con Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM) con 20% de suero fetal bovino inactivado en baño frío y luego se incubó a 37°C por 15 min, los residuos o sedimentos fueron removidos con pipetas Pasteur y la suspensión fue centrifugada a 2.600xg por 15 min para sedimentar a los parásitos; los cuales fueron resuspendidos en DMEM, se centrifugó a 164.000g por 60 min a 5°C. El sobrenadante se volvió a filtrar (0,2 μ m) y se dispensó en alícuotas y fue criopreservado a -70°C hasta su utilización posterior. Los eluidos se utilizaron a diluciones dobles, hasta encontrar el punto de corte óptimo para el ensayo.

De allí la fracción soluble de tripanosomas, del sobrenadante, fueron separados los extractos citosólicos del segundo pico de centrifugación isopícnica (Harrison *et al.*, 2003) purificados por cromatografía de columna y de capa fina. A estos sobrenadantes se les añadió un coctel de inhibidores de proteasas, se filtró (0,2 μ m) y se dispensó en alícuotas y se criopreservaron a -70 °C hasta su utilización posterior.

Los extractos antigénicos desnaturalizados de *T. vivax* se obtuvieron partiendo de la metodología utilizada por Rebeski *et al.* (2000), con aplicación de calor (baño de maría con agua hirviendo) en soluciones detergentes de SDS (dodecilsulfato sódico) y DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) como diluyente y aplicando un punto de corte de 30% para la categorización de positivos y negativos de los resultados, con las modificaciones que resultaron del proceso de producción. Este procedimiento provoca la destrucción de la estructura conformacional de los epítopes de los tripanosomas. Los extractos desnaturalizados, se dispensaron en alícuotas y se criopreservaron a -70 °C hasta su utilización posterior.



La concentración de proteína de cada preparado (producto antigénico) se determinó por el método de Lorwy (citado por Tamasaukas, 1995), haciendo uso del Kit de análisis Micro BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit Thermo Fisher Scientific, Inc). La concentración de proteínas totales en términos generales fue de 13, 17 y 15 mg/ml, respectivamente para cada tipo de extracto; lo cual representa un valor muy superior a los reportados para *T. vivax* al igual que para *T. evansi*.

Ac-ELISA homóloga

Para la ejecución de esta técnica se siguió el siguiente procedimiento de desarrollo propio; se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos, fondo en U, estériles, libres de DNAsa, RNAsa y DNA humano, no pirogénicas, manufacturadas bajo normas ISP 9001 (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates Thermo Scientific™).

El proceso se optimizó en base a la cantidad de antígeno adherido a la placa de 96 pocillos, la cual se estandarizó en dos concentraciones: 40µg/ml (columnas impares de la placa) y 20µg/ml (columnas pares de la placa) del extracto antigénico a ensayar, diluidos 1:800 en buffer fosfato Dulbecco (DPBS; 1,47 mM KH₂PO₄; 154 mM NaCl; 8,09 mM Na₂HPO₄, pH 7,3±0,1) y se colocaron 100µl de las preparaciones antigénicas, por pocillo con 40µg y 20µg de antígeno, intercalados, en cada columna (de la 1 a la 10), y fueron adheridos a las placas en incubación por 2 horas a 37°C en cámara húmeda y las placas se dejaron en congelación a -20°C para su sensibilización por 12 a 14 horas. En las columnas 11 y 12 fueron colocadas las concentraciones de 40µg y 20µg por filas.

Luego, las placas fueron lavadas por cinco veces, con buffer fosfato salino (PBS; 3,59 mM Na₂HPO₄.2 H₂O; 1,23 mM NaH₂PO₄.H₂O; 99,2 mM NaCl) con 0,1% de Tween-20, pH 7,2 (PBST), a fin de eliminar el excedente de antígeno no adherido.

Seguidamente se añadió el buffer de bloqueo (2% de IgG equino libre de suero en PBS, Sigma A6917 Sigma Anti-Horse IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in



rabbit) y 5% de leche descremada, a una cantidad total de la suspensión anterior, de 200µl en cada pocillo, incubándose las placas a 4°C por 4 horas; posteriormente se dejaron en congelación por 12 a 14 horas a -20°C. Al día siguiente, las placas fueron lavadas 5 veces con PBST, para descartar la solución de bloqueo excedente.

Se realizaron 2 réplicas utilizando controles fuertemente positivos (3A, 3B), medianamente positivos ((3C, 3D); débilmente positivos (3E 3F), negativos (3G, 3H), blancos (A1 a H2) y blancos controles del conjugado (A12 a H12). Los sueros controles de referencia (positivos y negativos fueron diluidos 1:1000 en PBST y colocados 100µl en cada pocillo, por duplicado (40µg y 20µg de Ag). Las columnas 5 a la 10, con sus filas A a la H, fueron usadas para los sueros problema de los animales muestreados. En tanto de la 11 (A11 a H11) fueron colocados sueros controles internos (+++, ++,+ y -). (Figura 19).

Las placas se incubaron por 45 min a 37°C en cámara húmeda y lavadas con PBST como descrito, para revelar los anticuerpos anti-*T.vivax*, se utilizó conjugado de IgG anti-bovina-peroxidasa (Sigma A5295, Anti-Bovine IgG (whole molecule)-Peroxidase antibody produced in rabbit), diluido 1:10000 en PBST, 50ml en cada pocillo. Las placas fueron incubadas a 37°C en cámara húmeda por 30 min y lavadas con PBST, secadas y en cada pocillo se añadió 50µl de solución de sustrato (ABTS 2,2-azino-bis-3-ethylbenz-thiazole-6-sulfonic acid al 2%, Sigma) manteniendo protegida de la luz las placas, y la reacción fue frenada a los 10 min por la adición de 100µl de H₂SO₄ (13,3 % en cada pocillo).

Las placas fueron colocadas en un lector de ELISA con filtro de 450nm y determinados los resultados (ELx 800, Bio-Tek Corporation, EUA). (Figura 19).

Para la determinación del punto de corte, se utilizaron 100 sueros negativos a *T. vivax* por todas las técnicas directas (Woo, frotis y QBC) e indirecta (IFI). El punto de corte fue considerado como el promedio de la Densidad Óptica (DO) de dichos sueros más dos desviaciones estándares.



Fue determinado para cada placa y se aceptó que el coeficiente de variación dentro y entre ellas fuera igual o menor al 13%. La fórmula utilizada fue la descrita por Madruga *et al.* (2000):

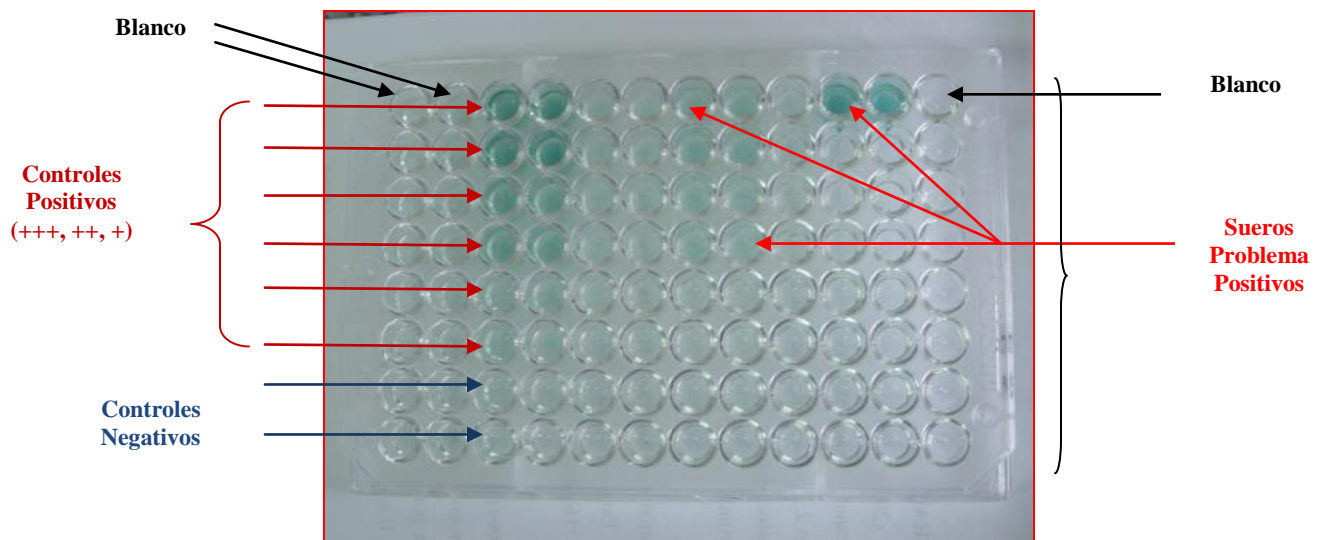
$F = \frac{P0 - N0}{Pt - Nt}$, donde F es el factor de ajuste, N0 es la media de la DO del suero negativo y P0 es la media de la DO del suero positivo. En tanto, Nt y Pt son, las medias de la DO de los mismos sueros negativos y positivos en la placa de prueba.

La DO ajustada (AOD) para el suero problema fue obtenido por la siguiente fórmula:

$AOD = F (St - Nt) + N0$, donde St es la media de la DO del suero problema.

Los sueros fueron considerados serológicamente positivos cuando la D.O obtenida fuera la media más dos desviaciones estándares de tres controles negativos, en cada serie de ensayos, pues se realizaron en diferentes días.

Figura 20. Resultados en Placa Ac-ELISA *T. vivax*, los pocillos con colores verdes (flechas de color rojo) en diferentes gradaciones, son muestras positivas



Fuente: Propia



Validación del Ac-ELISA con los Extractos Antigénicos de *T. vivax*:

Los valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valores predictivos positivo (VPP) y negativos (VPN), falsos positivos (FP) y falsos negativos (FN) así como de eficacia (Efic) se presentan en las tablas III y IV, para los extractos solubles citosólicos purificados fraccionados (ExSCPF) a las concentraciones de 40µg y 20µg, respectivamente.

Tabla III. Tabla de Contingencia Extracto *T. vivax* ExSCPF 40µg

RESULTADOS		IFI		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
Ac-ELISA	POSITIVO	96	04	100
	NEGATIVO	03	97	100
TOTAL		99	101	200

$S = 96/99 = 96,96\%$

$E = 97/101 = 96,03\%$

$VPP = 96/100 * 100 = 96$

$VPN = 97/100 * 100 = 97$

$FALSOS + = 1 - 0,9603 * 100 = 3,97\%$

$FALSOS - = 1 - 0,9696 * 100 = 3,04$

$EFICACIA (Efic): (96+97)/(200) * 100 = 96,5\%$

Tabla IV. Tabla de Contingencia Extracto *T. vivax* ExSCPF 20µg

RESULTADOS		IFI		TOTAL
		POSITIVO	NEGATIVO	
Ac-ELISA	POSITIVO	99	01	100
	NEGATIVO	01	99	100
TOTAL		100	100	200

$S = 99/100 * 100 = 99\%$

$E = 99/100 * 100 = 99\%$

$VPP = 99/100 * 100 = 99\%$

$VPN = 97/100 * 100 = 99\%$

$FALSOS + = 1 - 0,99 = 1\%$

$FALSOS - = 1 - 0,99 = 1\%$

$EFICACIA (Efic.): (99+99)/200 * 100 = 99\%$



Los valores predictivos obtenidos tanto positivos como negativos del Ac-ELISA, se encontraron dentro del rango recomendado por Jacobson (1998), con valores iguales o superiores al 95% (OIE, 2008; 2014).

Los extractos antigénicos crudos totales y desnaturalizados, a las mismas concentraciones, resultaron con menores valores de sensibilidad y especificidad, 95% y 90%, y 96% y 90%, respectivamente, por lo que no fueron validados para el Ac-ELISA en campo; seleccionándose los extractos solubles citosólicos purificados fraccionados, como fuente de antígenos, a las concentraciones de 20µg y 40µg.

Principales características resultantes de la encuesta aplicada en la RSIP de Valle de La Cruz

El núcleo familiar promedio está compuesto por 5 personas, con rango de edad de los encuestados entre 35 y 70 años, siendo 27,3% bachilleres (03), un 18,2% son analfabetas (02) y el resto estudió primaria. La experiencia en el trabajo de campo de las personas encuestadas va desde 09 años hasta 65 años. Es una experiencia que han aprendido del trabajo arduo en campo y de las enseñanzas transmitidas por sus padres y demás familiares. 100% tienen sistema de producción de ganadería doble propósito semi intensiva, que complementan con pequeñas áreas de siembra de maíz, leguminosas, yuca o conucos.

La producción de queso de mano ocurre en un 27,3% de los encuestados y el resto producen leche y venden a ruterio que produce queso en San Sebastián de Los Reyes. El 100% presenta ordeño manual con apoyo del becerro y con frecuencia de una vez al día. La mano de obra para el ordeño es completamente familiar. No se hace evaluación de calidad de leche ni diagnóstico de mastitis subclínica. La leche se comercializa caliente a nivel de la zona. El promedio de producción por vaca/día no supera los 4 litros. Aunque no se lleva registro esto es lo manifestado por los encuestados.

Hay un papel importante de la mujer en las tareas de la casa, del ordeño y la elaboración de queso. Son pequeños y medianos productores, con superficies máximas de 80 ha, aunque en



su mayoría son zonas boscosas, donde se desarrollan sistemas agrosilvopastoriles. Los predios presentan relieve de lomas teniendo muy pocas áreas planas y utilizando áreas comunes de pastoreo o potreros comunales. La zona es de difícil acceso lo que limita la posibilidad de acompañamiento técnico y formación para las personas en la zona. Los rebaños se presentan en cantidades que van desde 21 hasta 300 bovinos; aunque 72,7% están por debajo de 100 bovinos en sus rebaños.

En el 100% de los predios encuestados los rebaños están conformados por animales pertenecientes a diversos miembros del núcleo familiar. Los pastos que predominan son naturales pero en general hay siembras de pequeños lotes de pasto de corte (King Grass y Maralfalfa). Lo que se presentan son fallas en el manejo de los mismos, lo que hace que se lignifiquen considerablemente y pierdan sus cualidades nutritivas. 63,6% de los encuestados (07 productores y productoras) realizan suplementación estratégica de los animales. No obstante la misma, no es óptima por cuanto solo aplican Sal Roja sin minerales; el pasto de corte se presenta con niveles elevados de lignificación y la galleta (residuo de la industria galletera que dan a las vacas principalmente las de ordeño) no se conoce su composición nutricional. La suplementación se la dan es principalmente a las vacas de ordeño con énfasis en la época de sequía (enero – abril; a veces desde diciembre según cuando terminen las lluvias). En ninguna de las fincas han realizado diagnóstico previo de hemotrópicos o de otras enfermedades. Salvo en el caso de Brucelosis que 03 productores manifestaron haber realizado dicho diagnóstico hace más de un año pero no mostraron resultados.

Aproximadamente el 90% de los bovinos adultos no se encuentran identificados con hierro, lo que dificulta el seguimiento y la aplicación de diagnóstico sanitario. El 100% de los bovinos jóvenes no se encuentran identificados. El 100% de los productores no llevan registros. El 100% de los productores no pesan a los animales ni pesan la leche que se produce. El 100% presenta rebaños con monta natural multitoro. Presentan toros Brahman y mestizos *Bos taurus x Bos indicus* (F1).



El 100% de los rebaños son mosaicos constituidos por mestizajes diversos donde se presentan grupos raciales tales como: Brahman blanco, Brahman rojo, Pardo Suizo, Holstein, Carora, Gyr Lechero, entre otros. El 100% de los rebaños de las unidades de producción encuestadas, presentan garrapatas y tábanos. Para cada caso en condiciones distintas. Esta presencia de vectores hace posible la incidencia de hemotrópicos.

De la encuesta realizada a los productores y productoras, se pudo identificar el bajo nivel tecnológico de las unidades de producción así como las deficiencias en el manejo sanitario y alimenticio de los animales, lo que influye sobre la condición física de los animales y la baja productividad de los mismos y por ende afecta la condición socio económica de los productores y productoras.

Las características de los rebaños de la zona coinciden con un manejo tradicional del sistema de doble propósito en el trópico: pastoreo (mayormente pastos nativos), un ordeño diario y en forma manual, con apoyo del becerro y amamantamiento restringido (Florio *et al.*, 1998; Vaccaro; 1989). La leche obtenida en el ordeño es procesada en forma de queso a nivel de finca, siendo éste un producto que actúa como flujo de caja diario para la unidad de producción, coincidiendo con lo reportado por Arias, (1983); Pereira, (1989); Rodríguez, (1991) y Sulbarán *et al.* (2008).

Principales características resultantes de la encuesta aplicada en la RSIP de Carmen de Cura

Los resultados obtenidos en la encuesta aplicada a los productores y a las productoras, el procesamiento de los datos e interpretación de los mismos, se determinó que los principales factores de riesgo sanitarios en rebaños bovinos doble propósito, de la RSIP de Carmen de Cura, Camatagua, en el estado Aragua están asociados a:

- El valor obtenido de la seroprevalencia de 0% a Brucelosis en la RSIP y mantenimiento de predios No Reactores, producto de estudios anteriores y



corroborados con los análisis realizados en este estudio, lo cual hace susceptible a los rebaños.

- La compra y/o intercambio de animales de reposición sin conducción médica veterinaria adecuada.
- La ausencia de registros e identificación de los animales, en los predios.
- La inexistencia de corrales de cuarentena para el manejo preventivo y sanitario de los animales.
- El manejo y alimentación de los animales en potreros comunales hacen potencialmente viable el intercambio y desarrollo de la enfermedad en la RSIP.
- La mala condición corporal de los rebaños producto del mal manejo alimenticio, aunado a las condiciones climáticas estacionarias que limitan la disposición de alimentos, repercutiendo directamente sobre las condiciones inmunológicas de los animales.
- El manejo inadecuado de placentas y fetos, productos de abortos.
- Los antecedentes de eventos sanitarios por hemotrópicos, en base a signología clínica y exámenes de laboratorio.
- La no aplicación de tratamientos ni preventivos ni curativos para hemotrópicos, así como tampoco de administración de fármacos de soporte (antianémicos específicos, vitaminas, hidroterapia electrolítica).
- Inexistencia de un eficiente Programa Integral de Control de Vectores transmisores de enfermedades hemotrópicas, especialmente Tábanos y Stomóxidos, así como de garrapatas.

Otros elementos de interés sanitario, permitieron determinar con el instrumento aplicado que las vacunaciones realizadas por el Instituto Nacional de Salud Agrícola Integral (INSAI) son contra Fiebre Aftosa y Rabia, no vacunan contra Brucelosis carecen de certificados oficiales, existe una alta infestación por garrapatas y tabánidos, se reportan abortos en vacas y novillas en el primer tercio de la gestación, disposición de fetos



abortados en los potreros con una alta frecuencia de mastitis sobretodo en vacas de primer parto y lesiones podales en época de lluvias.

Existe por parte de los miembros de la RSIP un desconocimiento de elementos epidemiológicos de la brucelosis como zoonosis, sus implicaciones a la salud y daños potenciales de ésta enfermedad, por lo que es común el consumo de leche cruda del ordeño, manejo inadecuado de los fetos abortados, vacas gestantes, manipulación de animales. (aspectos generales de las zonas bajo estudio, Figuras 21, 22 y 23).

Respecto a los resultados de las fichas clínicas, en la Finca A, de los animales muestreados, el 80% de los animales son mestizos mosaicos, 10% mestizos Gyr, 6,7% mestizos Pardo Suizo y 3,3% Pardo. Las vacas representan el 86,7% de los animales muestreados en tanto 13,3% son machos. El 10% de las hembras horras, 26,7% paridas, 3,35 gestantes y 60% sin información sobre su estatus fisiológico. En tanto los machos 1 Toro y 3 mautes. La Condición Corporal Promedio de los animales de 3,4. En cuanto a otras condiciones clínicas: mucosas visibles en el 100% de los animales las tenían pálidas, las ubres de las vacas y ganglios de todos los animales muestreados, normales en el 100%, se observó moderado nivel de infestación de garrapatas en el 100% de los animales. La Finca presenta antecedentes de hemotrópicos en un anterior muestreo en el 2012. Se encuentra en el Programa Integrado para el Control de la Garrapata del Convenio Cuba – Venezuela bajo la directriz del INSAI.

En la Finca B, de los animales muestreados, un 4,8% son Gyr, 47,6% Brahman Rojo, 38,5% mestizos mosaicos, 4,8% Carora y 4,8% Pardo Suizo. Con un 76% de hembras y 24% machos; 28,6% mautas, 42,9% vacas, 14,3% novillas y 14,3% toros. De las hembras un 33,3% horras, 9,5% paridas, 4,8% lactante y 52,4% sin información sobre su estatus fisiológico. Los machos en monta. La Condición Corporal Promedio de los animales muestreados de 3,4. Apariencia general regular. En cuanto a otras condiciones clínicas observadas: mucosas visibles en el 100% de los animales las tenían pálidas, las ubres de las vacas y ganglios de todos los animales muestreados, normales en el 100%, se observó



moderado nivel de infestación de garrapatas en el 100% de los animales y en un 33,3% por tábanos. La Finca presenta antecedentes de hemotrópicos en un anterior muestreo. Se encuentra en el Programa Integrado para el Control de la Garrapata del Convenio Cuba – Venezuela bajo la directriz del INSAI.

En la Finca C, de los animales muestreados, el 61,9% son Brahman Rojo, Pardo Suizo 4,8% y 33,3% mestizos mosaicos. Con un 90% hembras y 10% machos; 71,4% vacas, 4,8% mautas, 14,3% novillas, 4,8% toro y 4,8% becerro (enfermo). De las hembras, 23,8% paridas, gestantes 28,6%, lactante vacía 4,8%, horras 14,3 y un 28,6% de los animales sin información sobre su estatus fisiológico. El toro en monta y un becerro enfermo. La Condición Corporal Promedio de los animales de 3,4. Apariencia general regular. En cuanto a otras condiciones clínicas observadas: mucosas visibles en el 100% de los animales las tenían pálidas, las ubres de las vacas y ganglios de todos los animales muestreados, normales en el 100%, se observó moderado nivel de infestación de garrapatas y por tábanos en el 100% de los animales. La Finca presenta antecedentes de hemotrópicos en un anterior muestreo. Se encuentra en el Programa Integrado para el Control de la Garrapata del Convenio Cuba – Venezuela bajo la directriz del INSAI.

Figura 21. Finca de Productores de la RSIP de Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua. Al margen del río Cura. 2013



Fuente: Propia

Figura 22. Potreros de la RSIP de Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua, con cultivos alternativos. 2013



Fuente: Propia

Figura 23. Panorámica General de los potreros de la RSIP de Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua. 2013



Fuente: Propia

Figura 24. Panorámica General de los potreros al margen del río Carmen de Cura, de la RSIP Carmen de Cura, Municipio Camatagua del estado Aragua. 2013



Fuente: Propia



Valores Hemáticos

En las fincas del estado Aragua, los valores hemáticos promedios encontrados, para Hto fue de 37,7% y para Hb de 12,6%. La amplitud del rango en los valores de Hto y Hb en cada rebaño, fue debido a la variabilidad de grupo racial en los animales, el estado fisiológico y la condición corporal y de peso; por lo que el rango mínimo de hematocrito a partir del cual se considera anémico un animal, se debió definir para cada rebaño.

De un 50 a 63,1% de los animales mostraron valores estadísticamente significativos inferiores al promedio ($p < 0,05$). Evaluando la asociación entre la condición corporal y color de las mucosas con los valores hemáticos y presencia de hemotrópicos se obtuvo que el 64,4% de los bovinos con condición corporal ≤ 3 mostraron presencia de al menos un tipo de hemotrópico (*T. vivax*, *A. marginale* y/o *Babesia spp.*) en el frotis sanguíneo, lo cual no es concluyente por cuanto la condición corporal también depende de otros factores como por ejemplo la nutrición y el estado fisiológico del animal; por ende habría que incrementar el número de animales a muestrear y controlar los factores antes mencionados.

El 57,8% de los bovinos presentaron Hto y Hb por debajo del promedio con condición corporal ≤ 3 ; 6,67% de los bovinos presentaron Hb o Hto por debajo del promedio con condición corporal ≤ 3 ; 42,3% de los bovinos presentaron Hto y Hb con mucosas claras o pálidas; 17,8% de los bovinos presentaron Hto y Hb por debajo del promedio con mucosas de color normal; mientras que el 24,5% de los animales presentaron Hb o Hto por encima del promedio con mucosas claras o pálidas.

Para la determinación del punto de corte y establecer el valor para la anemia, se realizó el análisis de la distribución de frecuencias, el cual dió como resultado que los animales con Hematocrito (Hto) igual o menor a 30% fueron clasificados como anémicos. Un total de 302 animales presentaron valores de $Hto \leq 30 \geq 25\%$, determinándose el punto de corte para la ubicación como anémicos aquellos animales que tuvieron un Hto igual o menor a 30%. (Tabla V).



Tabla V. Resumen de Distribución de Frecuencias de Hematocrito por Grupo. Guárico.

GRUPO	INTERVALOS HEMATOCRITO (n/%)					
	≤ 20.00	≥ 20.01 ≤ 25.00	≥ 25.01 ≤ 30.00	≥ 30.01 ≤ 35.00	≥ 35.01 ≤ 40.00	≥ 40.01
Grupo 1	0	9	103	67	99	34
Grupo 2	0	21	108	105	48	13
Grupo 3	0	8	91	91	110	11

Fuente: Elaboración propia.

El análisis de varianza (ANAVAR) mostró diferencias significativas para tratamientos y épocas de muestreo, pero no para la interacción tratamiento-época de muestreo. La comparación de medias mostró las diferencias entre épocas y tratamientos, como lo muestra la Tabla VI.

Tabla VI. Valores Promedios de Hematocrito (%) por Grupo, Época y Mes. Guárico

Mes-Año	Época	χ Época	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Ago-1	1	35,43 a	33,80	33,7	35,70
Sep-1			36,13	35,03	35,72
Oct-1	2	33,96 a	35,15	32,33	33,83
Nov-1			35,15	32,75	34,56
Dic-1	3	32,68 b	34,25	31,28	35,83
Ene-2			34,19	30,42	33,56
Feb-2			34,17	31,04	32,98
Mar-2			33,18	29,85	31,53
Abr-2	4	30,91 c	30,65	28,68	32,27
May-2			32,67	30,38	32,20
Jun-2	1	31,98 bc	32,92	30,25	32,92
Jul-2			32,48	31,73	33,65
Ago-2			33,25	29,68	31,81
Prom Anual			33,72 a	31,31 b	33,41 a

Fuente: Elaboración propia.

1=época lluvia, 2=transición lluvia-seco, 3=época seca, 4=transición seco-lluvia



a, b, c: letras diferentes refieren a diferencias significativas ($P < 0,05$) entre épocas (columnas) y entre tratamientos (filas).

Se observa una asociación tendencial entre baja condición corporal y mucosas claras o pálidas con presencia de hemotrópicos y anemia.

Diagnóstico Parasitológico

Prevalencia y Parasitemia: En relación al diagnóstico de hemotrópicos, en las fincas del estado Aragua, se obtuvo valores de Prevalencia de *T. vivax* 37,7%, *Anaplasma marginale* 66,6%, *B. bigemina* 22,2% y *B. bovis* 13,3% por FCB. En tanto los valores de Parasitemia fueron de *T. vivax* 5%, *Anaplasma marginale* 12%, *B. bigemina* 1,3% y *B. bovis* 1,2%.

Tabla VII. Prevalencia *Trypanosoma vivax* entre Municipio. Estado Guárico.

Municipio	Prevalencia por Municipio (%)	Finca	Total de Muestras (n)	Prevalencia por Finca (%)
Mellado	83,00 <i>a</i>	A	45	93,33
		B	12	8,33
		C	43	93,47
Miranda	25,77 <i>b</i>	D	45	15,55
		E	52	34,61
Las Mercedes	13,75 <i>bc</i>	F	80	13,75
S. J Guaribe	10,00 <i>cd</i>	G	70	11,42
		H	19	5,26
		I	21	9,52
Ribas	5,38 <i>cd</i>	J	38	13,15
		K	55	0
Sta. María de Ipire	0 <i>d</i>	L	47	0
TOTAL			527	25,62

Fuente: Elaboración propia

a,b,c,d: letras diferentes indican diferencias significativas en los promedios de la prevalencia por municipio (columna)



En cuanto a los valores de Prevalencia en el estado Guárico, fue de 25,62% (intervalo de confianza al 95% entre 21,89% - 29,34%), al considerar un total de 12 fincas estudiadas en los seis (6) Municipios del estado Guárico. Con diferencias significativas entre Municipios como lo muestra la Tabla VII.

Las fincas donde fue mayor el valor de la prevalencia a *T. vivax* fueron la C (93,47%) y la A (93,3%) localizadas en el Municipio Julián Mellado, seguidas por la E (34,61%) y la E (15,55) en el Municipio Francisco Miranda.

En tanto el valor promedio de Parasitemia para *T. vivax* fue de 5%. No se determinó para otras especies hemotrópicas pues no fueron observadas otras formas parasitarias.

En la Tabla VIII se presentan los valores de Prevalencia y Seroprevalencia por Ac-ELISA heteróloga y Ac-ELISA homóloga, obtenidos con extractos antigénicos de *T. evansi* y *T. vivax*, respectivamente; resultados en 754 muestras procesadas de bovinos en los 05 estados llaneros.

Tabla VIII. Prevalencia y Seroprevalencia de *T. vivax* en 05 estados de la Región Centro Llanera de Venezuela -Ac ELISA con Extractos antigénicos de *T. evansi* y de *T. vivax*

Estado	Prevalencia (%)	Ac ELISA <i>T. evansi</i> (%)	Ac ELISA <i>T. vivax</i> 20ug (%)	Ac ELISA <i>T. vivax</i> 40ug (%)
Apure	0,83 ^a	98,3	85,2	80,3
Aragua	8,47 ^b	82,5	74,2	74,2
Barinas	16,66 ^{bcd}	94,0	90,1	87,3
Cojedes	17,50 ^{bd}	100,0	82,5	85,0
Guárico	24,90 ^d	90,8	80,9	83,9
Total		754 muestras		

En cuanto a la distribución promedio por estado de las prevalencias de infecciones activas por *T. vivax* fueron obtenidos los siguientes resultados: 0,83% Apure, 8,47% Aragua, 16,66% Barinas, 17,5% Cojedes y 24,90% Guárico. Demostrando que el estado Guárico



fue el más prevalente seguido de Barinas y Aragua, con diferencias significativas ($P < 0,50$) al ajustar por número de fincas y número de animales.

Seroprevalencia: En el estado Aragua, el valor promedio de seroprevalencia por Ac-ELISA fue 95,5%, ésta última con valores de sensibilidad del 90% y especificidad del 92%, concordancia del 97% e índice *kappa* de 0,93, en base a 100 sueros de referencia (50 positivos y 50 negativos). Estos resultados denotan una elevada prevalencia y seroprevalencia coincidiendo con diversos estudios realizados en Venezuela.

En tanto en las fincas de Guárico, la seroprevalencia general promedio del estado fue de 88,65%, con diferencias significativas entre Municipios como lo muestra la Tabla IX, con un intervalo de confianza al 95% entre 85,95% - 91,36%. Con los mayores valores en los Municipios Francisco de Miranda (95,96%) y Las Mercedes del Llano (92,5%) y el menor en el Municipio Santa María de Ipire (72,91%).

Tabla IX. Valores de Seroprevalencia *Trypanosoma vivax* por finca / municipio Estado Guárico.

Municipio	Seroprevalencia por Municipio (%)	Finca	Total Animales (n)	Seroprevalencia por Finca (%)
Miranda	95,96 <i>a</i>	D	45	100
		E	54	92,59
Las Mercedes	92,5 <i>a</i>	F	80	92,5
Ribas	89,16 <i>a</i>	J	55	85,45
		K	28	96,42
S. J Guaribe	88,7 <i>a</i>	G	74	91,89
		H	19	63,15
		I	22	100
Mellado	85,58 <i>a</i>	B	12	41,66
		C	46	95,65
		A	46	96,95
Sta María de Ipire	72,91 <i>b</i>	L	48	72,91
TOTAL			529	88,65

Fuente: Elaboración propia



a,b: letras diferentes indican diferencias significativas en los promedios de la prevalencia por municipio (columna)

En la Tabla IX están los valores promedios de la seroprevalencia del *T. vivax* por finca, siendo mayor en la D (100%, en el Municipio Francisco de Miranda) y en la I (100%, en el Municipio San José de Guaribe), seguidas por la A (96,95%, en el Municipio Julián Mellado) y la J (96,42%, en el Municipio Ribas), en tanto el menor valor fue en la B (41,66%, en el Municipio Julián Mellado).

El valor de la seroprevalencia por Ac-ELISA homóloga, fue menor que los obtenidos con otros protocolos que utilizan antígenos de *T. evansi* por su menor especificidad, así como por ser un área endémica con infecciones activas en vista de los altos valores de prevalencia y parasitemia del *T. vivax* determinados.

Tabla X. Valores por Finca de la Seroprevalencia (SP) de *T. vivax* por Ac ELISA en 20 fincas con Extracto antigénico especie-específico de *T. vivax* (ExSCPF, 20µg y 40µg) y Extracto *T. evansi*

No.	Estado	Finca	No. Muestras	Ac ELISA <i>T. evansi</i>	Ac ELISA <i>T. vivax</i> 20ug	Ac ELISA <i>T. vivax</i> 40 ug
1	Guárico	A	45	95	100	96
2	Barinas	B	22	90	91	82
3	Cojedes	C	40	100	83	85
4	Guárico	D	46	97	83	87
5	Aragua	E	22	90	73	77
6	Guárico	F	28	96	64	68
7	Guárico	G	46	96	83	89
8	Guárico	H	45	100	73	76
9	Apure	I	40	100	90	93
10	Guárico	J	22	100	91	95
11	Guárico	K	19	65	79	84
12	Apure	L	28	100	86	75
13	Apure	M	15	95	80	73
14	Guárico	N	28	80	77	73
15	Barinas	Ñ	28	98	89	93



16	Guárico	O	80	95	86	86
17	Guárico	P	12	75	67	75
18	Aragua	Q	59	75	75	71
19	Guárico	R	74	95	88	89
20	Guárico	S	55	95	80	89
TOTAL			754	92	82	83

Fuente: Propia

Analizando el valor global de la seropositividad observada en campo con ambas técnicas serológicas, IFI (Figura 25) y Ac-ELISA (Figura 20), los resultados mostraron un importante porcentaje de prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma* spp. en los animales muestreados. Aunque no se observó diferencia estadística significativa entre ambas técnicas ($p < 0,05$), ésta fue considerable alta por ambas metodologías (Ac-ELISA: 88,65%; IFI: 88,80%).

Tabla XI. Valores por Estado de la Seroprevalencia (SP) de *T. vivax* por Ac ELISA en 20 fincas con Extracto antigénico especie-específico de *T. vivax* (ExSCPF, 20µg y 40µg) y

Extracto *T. evansi*

Estado	Ac ELISAT <i>evansi</i>	Ac ELISA <i>T. vivax</i> 20ug	Ac ELISA <i>T. vivax</i> 40ug
Apure	98 ^a	85 ^b	80 ^c
Aragua	83 ^a	74 ^b	74 ^a
Barinas	94 ^a	90 ^b	87 ^a
Cojedes	100 ^a	83 ^b	85 ^b
Guárico	91 ^a	81 ^b	84 ^b
TOTAL		754 muestras	

a,b,c Primeras letras diferentes muestran diferencias estadísticas significativas en los promedios (filas) ($P < 0,05$)

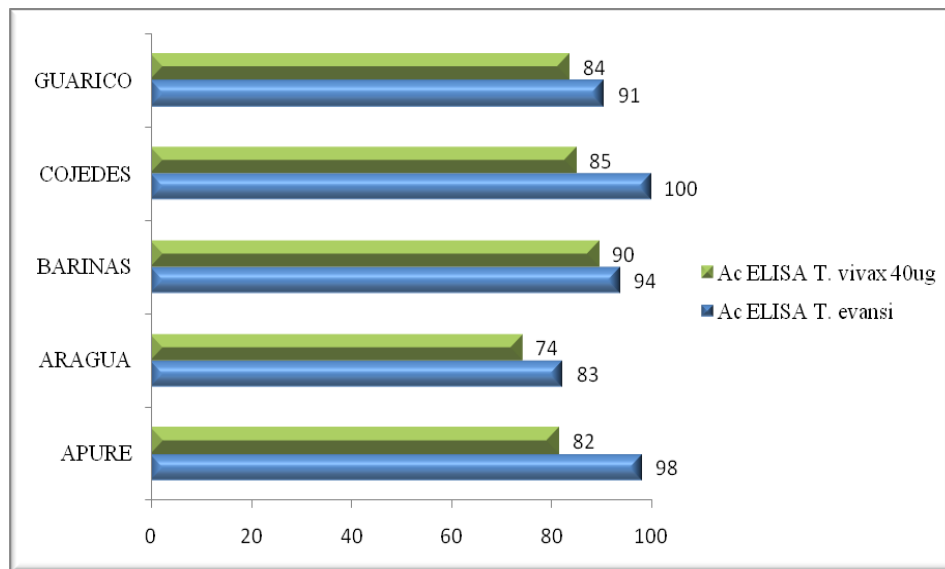
Fuente: Propia

En los Gráficos 1, 2 y 3 se observa la distribución de las seroprevalencias encontradas con los Ac ELISA preparada con antígenos especie-específicos de *T. vivax* (a concentración de 20µg y 40µg) comparados con los valores obtenidos en las mismas muestras de suero procesadas con la Ac Elisa heteróloga con extractos antigénicos de *T. evansi*.



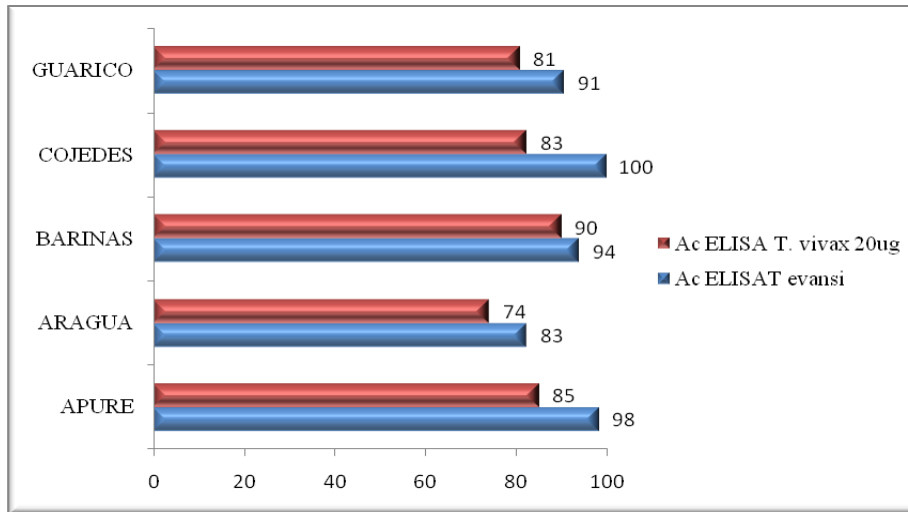
En términos generales, los valores de la seroprevalencia por Ac-ELISA homóloga con extractos especie-específicos de *T. vivax* resultaron menores a los encontrados con el Ac-ELISA de *T. evansi*, como esperado en virtud de la reactividad cruzada, así como por las reacciones inespecíficas resultante de los procesos de producción de los materiales antigénicos de este último parásito, que derivan en un mayor número de posibles falsos positivos.

Gráfico 1. Ac-ELISA *T. vivax* 40µg vs *T. evansi*



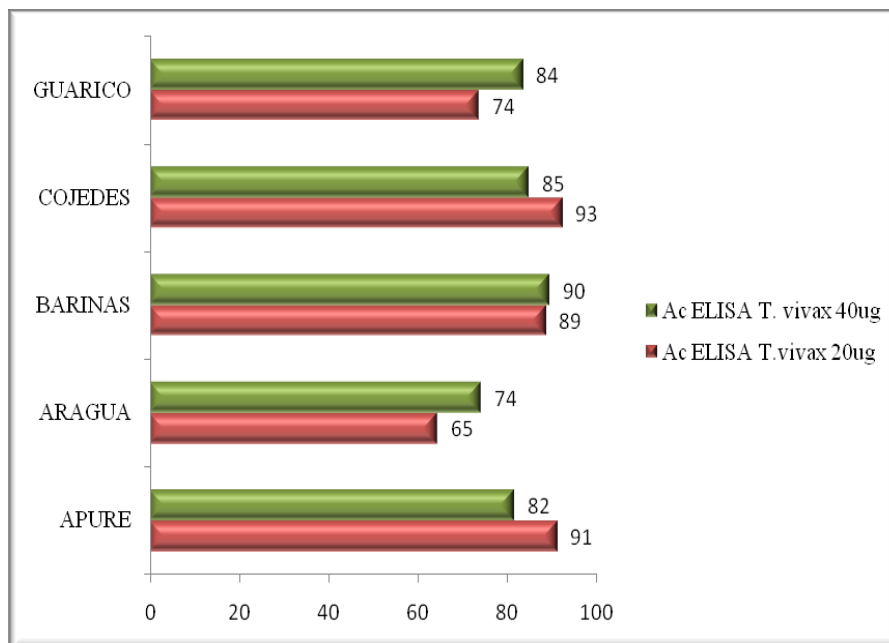
Fuente: Propia

Gráfico 2. Ac-ELISA *T. vivax* 20µg vs *T. evansi*



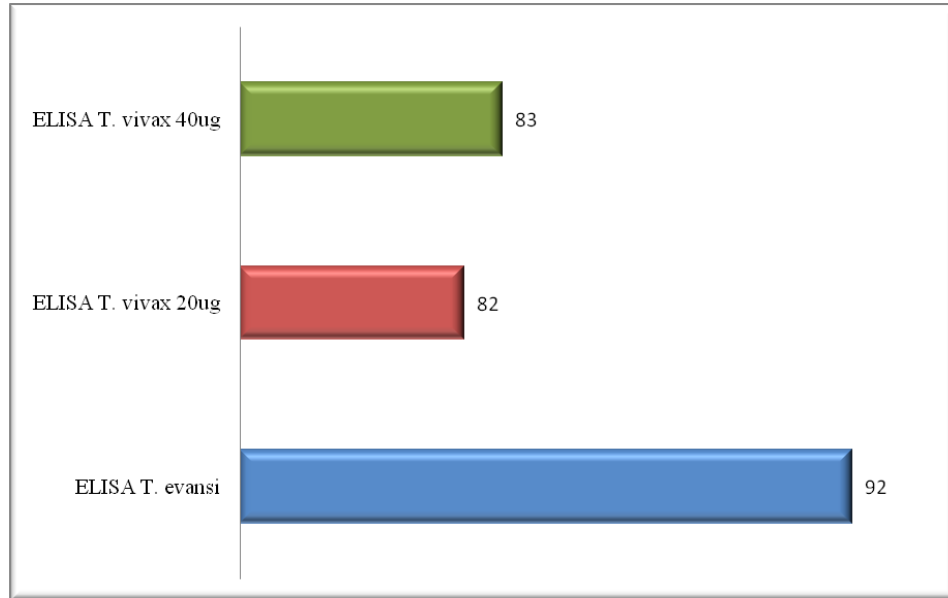
Fuente: Propia

Gráfico 3. Ac-ELISA *T. vivax* 40µg vs *T. vivax* 20µg



Fuente: Propia

Gráfico 4. Ac-ELISA *T. vivax* 40 μ g vs *T. vivax* 20 μ g vs *T. evansi*

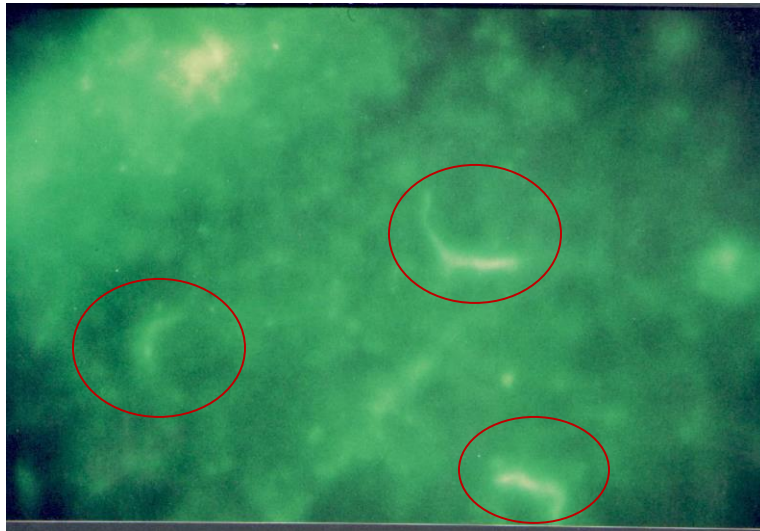


Fuente: Propia

La concentración de 20 μ g del extracto antigénico ExSCPF del *T. vivax* no presentó diferencias significativas con la de 40 μ g, por lo que la primera de ellas (20 μ g) resultó ser la cantidad de proteína antigénica especie-específica de *T. vivax* recomendada economizándose reactivos para el desarrollo de la técnica de ELISA, ya que para la Ac ELISA heteróloga con *T. evansi* se requiere de 40 μ g/ml hasta 150 μ g/ml de material antigénico en diversos protocolos.

Hubo una alta probabilidad de que cualquier muestra Ac-ELISA-negativa resultase también negativa por la evaluación de la IFI, situación que es interesante desde el punto de vista de la identificación de animales negativos en estudios epidemiológicos, visto que los protocolos de ambas técnicas fueron realizadas con antígenos especie-específicos de *T. vivax*.

Figura 25. Suero fuertemente positivo a *T. vivax* en IFI (100X)



Fuente: Propia

En tanto en estudios de IFI con *T. vivax* y Ac-ELISA con antígeno de *T. evansi* las diferencias son significativas, dada la especificidad de especie del material antigénico, que contrasta con la reactividad cruzada enunciada por algunos autores que valoran el uso de Ac-ELISA heterólogo solo con la ventaja de ésta última, fundamentalmente debido a la mayor facilidad para la expansión y purificación de los parásitos durante la preparación de los antígenos.

Ventaja que se superaría con *T. vivax* manteniendo los extractos antigénicos especie-específicos en alícuotas en criopreservación, para lo cual se requieren estudios de evaluación de la viabilidad de dicho material a lo largo del tiempo.

Además que la concentración de material antigénico para la Ac-ELISA en este caso de productos especie-específicos de *T. vivax* (20µg/ml) es menor que el utilizado en los protocolos de Ac-ELISA con *T. evansi* que requieren al menos de 40µg de material antigénico para cada pocillo de la microplaca.

Visto que la diferencia de los valores obtenidos en sensibilidad (95% vs 96%) entre las dos concentraciones de *T. vivax* (20µg/ml vs 40µg/ml) no resultó con diferencias estadísticas



significativas, se infiere que el requerimiento de menor cantidad de antígeno resulta ventajoso en cuanto a la producción de material antigénico en ensayos a escala mayor.

Los menores valores de prevalencia serológica observada con el extracto antigénico ExSCPF del *T. vivax* en algunas fincas, se explica por la convivencia en esos predios con poblaciones de chigüires y ovinos, especies que son reservorios de *T. evansi*, de allí que, el Ac ELISA heterólogo estaría dando resultados falsos positivos a *T. vivax* por la reactividad cruzada que expresa aquel sistema.

En el presente estudio, el protocolo de Ac-ELISA homólogo empleado, con extractos solubles citosólicos purificados fraccionados (ExSCPF) especie-específicos de *T. vivax* (20 μ g) bajo el proceso de producción de calidad, mostró una sensibilidad del 95% y especificidad del 96%, concordancia del 97% e índice *kappa* de 0,95 en base a sueros de referencia (100 positivos y 100 negativos), similares valores a los encontrados por Tamasaukas *et al.* (2012) quienes determinaron seroprevalencia de *T. vivax* por inmunofluorescencia indirecta (IFI), en 88,8% (40/45) y por Ac-ELISA de 95,5% (43/45).

En tanto el ensayo con 40 μ g de antígeno especie-específico de ExSCPF, mejoró la especificidad, con especificidad de 97% y sensibilidad 96% y al ser evaluados con los sueros controles, bajo las condiciones de estandarización con 100 sueros controles, 97 sueros negativos y 96 positivos coincidieron con los resultados de referencia, lo que representó 97% de concordancia con índice *Kappa* de 0,93. (Tabla VII)

La eficacia del Ac ELISA homólogo (antígenos de *T.vivax*) con ExSCPF a 20 μ g fue del 99%, en tanto con ExSCPF a 40 μ g fue menor (96,5%)

En cuanto a la repetibilidad/reproducibilidad de los ensayos, se observan los resultados en la Tabla XII; donde se observa que todos los valores presentaron coeficientes de variación igual o menor al 13% establecido como estándar válido.



Así mismo, en la repetibilidad del ensayo (intra-ensayo) el coeficiente de variación presentó valores mucho menores (2,80 a 6,00%) que los observados en la reproducibilidad del ensayo (entre ensayos) cuyos valor máximo fue de 10%.

Tabla XII. Valores de sensibilidad, especificidad y concordancia en ensayo Ac-ELISA homólogo con 40µg/ml de extracto antigénico especie-específico de *T. vivax*. Ensayo de Validación (EPIDAT 3.1)

Sueros	Pruebas Referencias	ELISA		IFI	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
POSITIVOS	100	96	4	99	01
NEGATIVOS	100	03	97	01	99
Valores					
Criterio de Validación	ELISA		IFI		
SENSIBILIDAD	96%		99%		
ESPECIFICIDAD	97%		99%		
CONCORDANCIA	97%		99%		
ÍNDICE KAPPA	0,93		0,98		
VPP	96,96%		99,00%		
VPN	96,03%		99,00%		

(VPP= Valor Predictivo Positivo; VPN=Valor Predictivo Negativo)

	Ac ELISA – <i>T.vivax</i>	IFI
Índice de validez (%)	96,50	99,30
Índice de Youden	0,93	0,98
Razón de verosimilitud +	24,48	64,01
Razón de verosimilitud -	0,03	0,10



Fuente: Elaboración Propia

En el proceso de validación se determinaron los siguientes valores: Índice de validez: proporción correcta de aciertos, definen la proporción de individuos clasificados correctamente, siendo de 96,5% para Ac-ELISA y 99,3% para IFI. El Índice de Youden: cercanos a 1, mayor en IFI que en ELISA, aunque ambos resultados son eficientes, visto que cuánto más cercano a 1, mejor desempeño de la prueba diagnóstica que se está evaluando, sin relacionar la S y E de ambas pruebas. Y el de Verosimilitud: indicador de riesgo relativo, reflejaron buen desempeño de los ensayos, mucho mayor la positiva en IFI (64,01) que en Ac-ELISA (24,48) en ambas técnicas, es evidente que se desprende el complemento la respuesta a la pregunta ¿cuántas veces más probable es que la prueba sea negativa en los positivos que en los no positivos?. Una buena prueba debe tener una RV- cercana a 0 y una RV+ alta (no es posible especificar un límite superior para la RV+). La razón de verosimilitud combina la información que proviene de la sensibilidad y la especificidad y es definida como la razón entre la probabilidad de un resultado de una prueba en sujetos enfermos o infectados o positivos y la probabilidad del mismo resultado en sujetos no enfermos o no infectados o no positivos.

La Eficacia del Ac ELISA homólogo (antígenos de *T.vivax*) con ExSCPF a 20µg/ml fue del 99%, en tanto con ExSCPF a 40µg/ml fue menor (96,5%; este último con un altísimo grado de concordancia, de 0,93 en la Ac-ELISA y 0,98 en IFI.

Tabla XIII. Variación intra y entre ensayos de la Ac-ELISA con extracto antigénico especie-específico de *Trypanosoma vivax* para la detección de anticuerpos anti-*T. vivax*

MEDIDA	DENSIDAD ÓPTICA, PORCENTAJE DE POSITIVOS / NEGATIVOS			
	Suero Control fuertemente positivo	Suero Control medianamente positivo	Suero Control débil positivo	Suero Control negativo



Ensayos	15	15	15	15
Media de las réplicas	197	89,23	54,81	17,00
Desviación estándar entre-ensayo	19,80	8,20	4,80	7,60
Coefficiente de variación (%) entre- ensayos	10,00	9,20	8,80	4,70
Desviación estándar intra-ensayo	6,18	4,50	1,56	1,00
Coefficiente de variación (%) intra-ensayo	3,00	5,00	2,80	6,00

Fuente: Elaboración Propia.

Valores de Absorbancia (D.O.) de las réplicas por tipo de extracto antigénico de *T. vivax*

En la Tabla XIV se observan los valores encontrados de densidades ópticas en los 15 ensayos (5 réplicas / 3 ensayos) de cada extracto antigénico de *T. vivax* evaluado, obteniéndose puntos de corte variables, con valor mínimo de 0,209 (ExD) y máximo de 0,583 (ExSCPF). Se presentan los valores positivos y negativos, mínimos y máximos determinados para cada réplica.

Tabla XIV. Valores de Absorbancia (Densidades Ópticas) en las Réplicas Intra e Inter-Ensayos.

Identificación del Ensayo (Réplica)	Número de Ensayos	Producto Antigénico	Punto de Corte	Valor Positivo Mínimo-Máximo Densidad Óptica (D.O.)	Valor Negativo Mínimo-Máximo Densidad Óptica (D.O.)
ELISA-1	5	Extracto crudo total	0,353	0,379 - 1,066	(-0,084) - 0,350
	5	Extracto soluble citosólico purificado fraccionado	0,404	0,422 - 1,819	(-0,122) - 0,392
	5	Extracto antigénico desnaturalizado	0,224	0,225 - 0,789	(-0,155) - 0,221
	5	Extracto crudo total	0,308	0,309 - 1,325	(-0,052) - 0,302



ELISA-2	5	Extracto soluble citosólico purificado fraccionado	0,432	0,524 - 1,507	(-0,025) - 0,411
	5	Extracto antigénico desnaturalizado	0,231	0,234 - 1,731	0,044 - 0,228
ELISA-3	5	Extracto crudo total	0,328	0,333 - 0,991	(-0,142) - 0,321
	5	Extracto soluble citosólico purificado fraccionado	0,583	0,624 - 2,124	0,285 - 0,413
	5	Extracto antigénico desnaturalizado	0,209	0,212 - 1,339	0,016 - 0,203

Fuente: Elaboración Propia.

En el presente trabajo el punto de corte se determinó como la media más 2 desviaciones estándar de 3 controles negativos, visto que los sueros controles débil y fuertemente positivos y los controles negativos, provienen de animales experimentales y de campo, probados por IFI, cuyas muestras fueron caracterizados a través de métodos parasitológicos directos (Woo, frotis delgado de capa blanca, coloreados con Giemsa al 10% y QBC®) y serológicos (IFI y ELISA indirecto).

En las figuras 26, 27 y 28 se presentan ejemplos de los gráficos de dispersión de los valores de las densidades ópticas obtenidas en cada tipo de extracto antigénico evaluados: extracto crudo total, extracto soluble citosólico fraccionado purificado y extracto desnaturalizado.

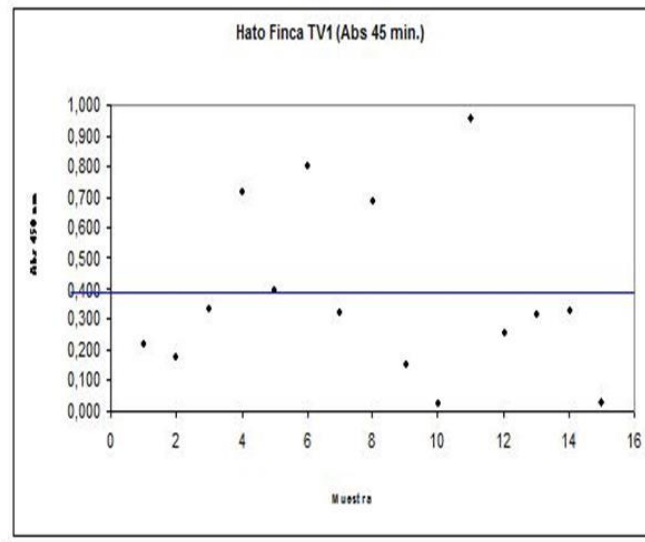
Figura 26. Valores de Densidades Ópticas en un ensayo de Ac-ELISA: Extracto Crudo Total



PREVALENCIA SEROLÓGICA <i>T. vivax</i> Ac-ELISA -1						
	Total		Positivos		Negativos	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Casos	15	100,00	5	33,33	10	66,67

Muestra	No.	D.O
1	1	0,225
2	2	0,181
3	3	0,339
4	4	0,714
5	5	0,397
6	6	0,800
7	7	0,325
8	8	0,688
9	9	0,157
10	10	0,032
11	11	0,958
12	12	0,259
13	13	0,318
14	14	0,331
15	15	0,031
Total Muestras: 15		

Punto de corte: 0,353



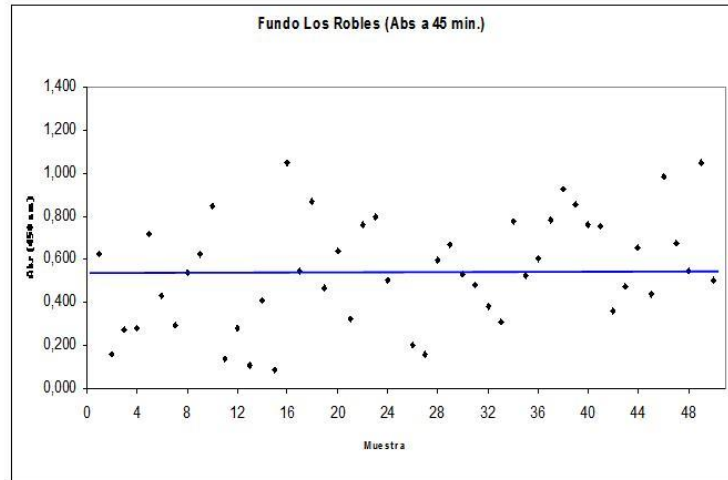
Fuente: Propia

Figura 27. Valores de Densidades Ópticas en un ensayo de Ac-ELISA: Extracto Soluble Citosólico Fraccionado Purificado



PREVALENCIA SEROLÓGICA <i>T. vivax</i> Ac-ELISA -2						
	Total		Positivos		Negativos	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Casos	50	100,00	27	54,00	23	46,00

Muestra	No.	O.D.
1	1	0,828
2	2	0,163
3	3	0,276
4	4	0,282
5	5	0,732
6	6	0,434
7	7	0,297
8	8	0,642
9	9	0,632
10	10	0,561
11	11	0,135
12	12	0,282
13	13	0,110
14	14	0,411
15	15	0,087
16	16	1,061
17	17	0,642
18	18	0,271
19	19	0,468
20	20	0,640
21	21	0,322
22	22	0,789
23	23	0,561
24	24	0,602
25	25	-0,028
26	26	0,199
27	27	0,161
28	28	0,688
29	29	0,870
30	30	0,636
31	31	0,478
32	32	0,383
33	33	0,312
34	34	0,776
35	35	0,636
36	36	0,500
37	37	0,788
38	38	0,828
39	39	0,887
40	40	0,726
41	41	0,787
42	42	0,359
43	43	0,472
44	44	0,668
45	45	0,442
46	46	0,681
47	47	0,878
48	48	0,646
49	49	1,047
50	50	0,601
Total Muestras: 50		



Punto de corte: 0,432

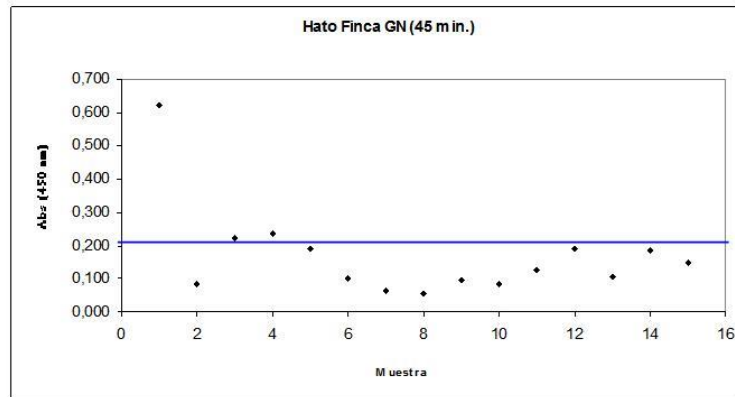
Fuente: Propia

Figura 28. Valores de Densidades Ópticas en un ensayo de Ac-ELISA: Extracto Desnaturalizado



PREVALENCIA SEROLÓGICA <i>T. vivax</i> Ac-ELISA-3						
	Total		Positivos		Negativos	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Casos	15	100,00	3	20,00	12	80,00

Muestra	No.	D.O
0024	1	0,626
0025	2	0,085
Toro	3	0,226
Toro 2	4	0,235
0105	5	0,190
0121	6	0,101
0111	7	0,063
0012	8	0,057
0112	9	0,099
Mauta	10	0,083
0145	11	0,129
0056	12	0,190
0078	13	0,107
0067	14	0,184
0019	15	0,148
Total Muestras: 15		



Punto de corte: 0,209

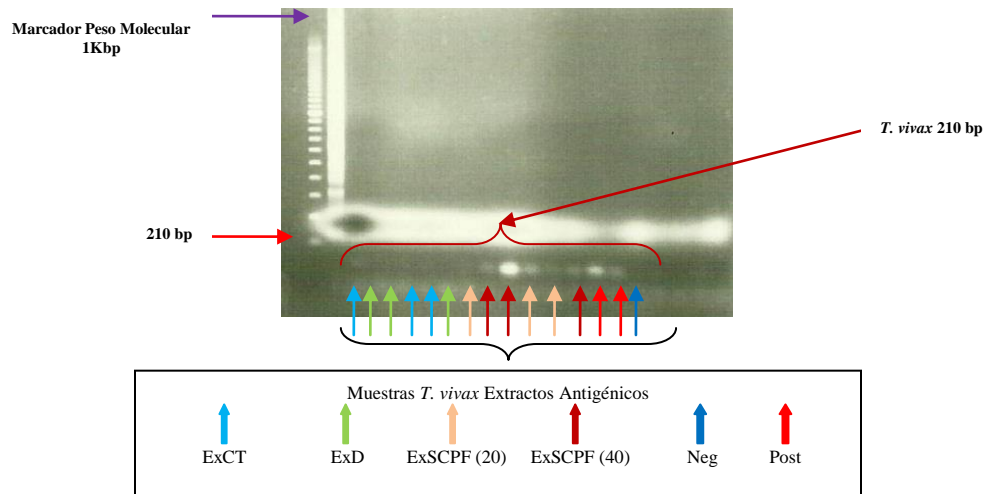
Fuente: Propia

PCR

Los resultados de las corridas electroforéticas de PCR se presentan en las figuras 29, 30 y 31; demostrándose las bandas de 210 pares de bases, esperadas por los cebadores utilizados, correspondientes a los materiales de *T. vivax*, en base a sus controles positivos y negativos, respecto a especies con distancia filogenética muy separadas entre sí, a saber, *T. brucei*, *T. congolense savannah* y *T. congolense forest* de origen africano, aislados de animales infectados en forma experimental y controlada.

Para los tripanosomas africanos los cebadores usados ITS1BR / ITS2BR para *T. brucei* con banda de 480pb; ITS1CF / ITS2CF para *T. congolense forest* con banda de 700pb y ITS1CS / ITS2CS para *T. congolense savannah* con banda de 680pb y para *T. vivax* del aislado y extractos antigénicos, fueron los cebadores TviSL1/TviSL2 con bandas de 210pb. Los controles usados en este estudio para PCR fueron donados por el CIRDES, a los efectos de generar nuevos controles positivos y negativos de sueros de animales nacionales probados y contrastados con los de referencia internacional.

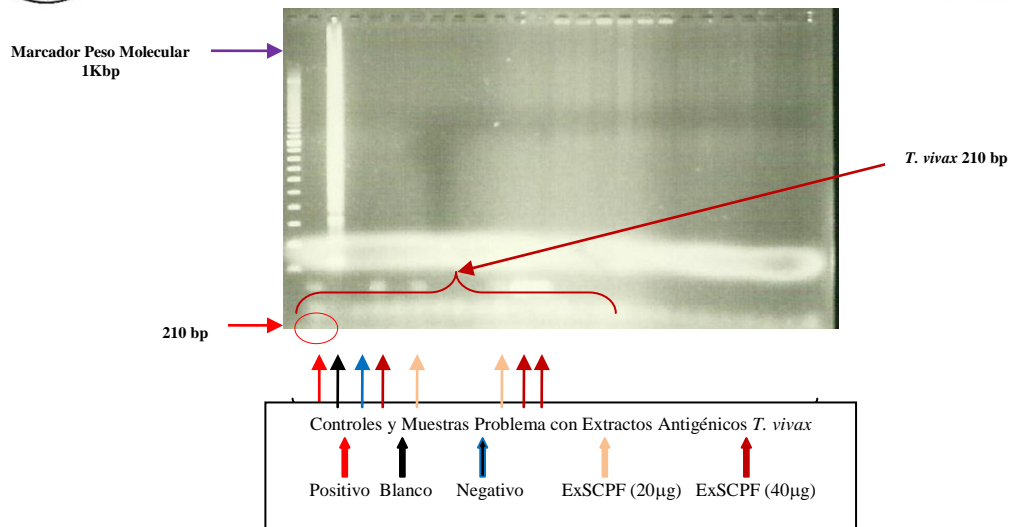
Figura 29. Corrida electroforética en gel de agarosa con extractos antigénicos especie-específicos de *T. vivax* (ExCT, ExD, ExSCPF 20 μ g, ExSCPF 40 μ g)



Nota 1: ExCR=Extracto Crudo Total; ExD= Extracto Desnaturalizado; ExSCPF(20) = Extracto Soluble Citosólico Purificado Fraccionado a concentración de 20 μ g, ExSCPF (40) = Extracto Soluble Citosólico Purificado Fraccionado a concentración de 40 μ g; Neg=Negativo; Post= Positivo.

Nota 2: Arreglo del gel por carril: Referencia de Peso molecular 1kbp, Blanco, ExCT, ExD, ExD, ExCT, ExCT, ExD, ExSCPF (20), ExSCPF (40), ExSCPF (40), ExSCPF (20), ExSCPF (20), ExSCPF (40), Control Positivo, Control Positivo, Control Negativo

Figura 30. Corrida electroforética en gel de agarosa con extractos antigénicos especie-específicos de *T. vivax* (ExSCPF 20 μ g y 40 μ g)



Nota 1: ExCR=extracto crudo total; ExD= extracto desnaturalizado; ExSCPF(20) = Extracto soluble citosólico purificado fraccionado a concentración de 20µg, ExSCPF (40)= Extracto soluble citosólico purificado fraccionado a concentración de 40µg; Neg=Negativo; Post= Positivo.

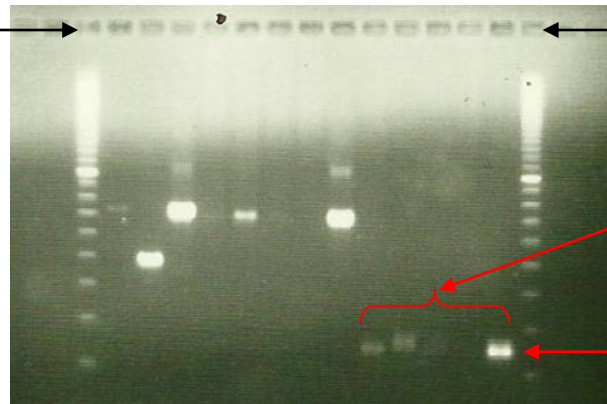
Nota 2: Arreglo del gel por carril: Marcador de Peso molecular 1 Kbp, Control Positivo, Blanco, Control Negativo, Muestras Problemas Pareadas con ExSCPF en concentraciones de: 40, 40, 20, 20, 40, 40, 20, 20.....

Figura 31. Corrida electroforética en gel de agarosa con control de antígenos especie-específicos de *T. vivax* contrastados con *T. brucei*, *T. congolense forest*, *T. congolense savannah*, controles positivos y negativos a *T.vivax*



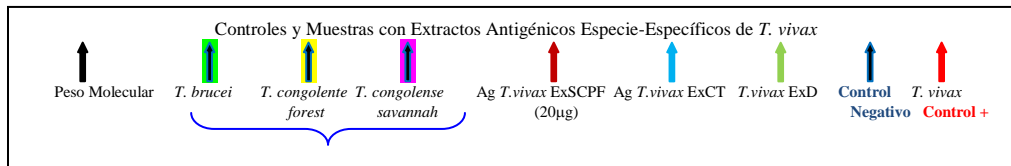
Marcador Peso Molecular 1Kbp

Marcador Peso Molecular 1Kbp



T. vivax

210 bp



Nota 1: ExCR=extracto crudo total; ExD= extracto desnaturalizado; ExSCPF(20) = Extracto soluble citosólico purificado fraccionado a concentración de 20µg, ExSCPF (40)= Extracto soluble citosólico purificado fraccionado a concentración de 40µg; Neg=Negativo; Post= Positivo.

Nota 2: Arreglo del gel por carril: Marcador de Peso molecular 1 Kbp, *T. congolense* débil +, *T. brucei* fuerte +, *T. congolense forest* fuerte +, Control Negativo, *T. congolense forest* débil +, *T. congolense savannah* débil +, Control Negativo, *T. congolense savannah* fuerte +, Muestras de extractos antigénicos *T. vivax* ExSCPF 20µg, ExCT 20µg y ExD 20µg, Control Negativo, Control Positivo *T. vivax*, Marcador de Peso molecular 1 Kbp.

7. DISCUSIÓN

Se observó una asociación tendencial entre baja condición corporal y mucosas claras o pálidas con presencia de hemotrópicos y anemia. Sinshaw *et al.* (2006) reportaron para bovinos, una correlación negativa entre condición corporal y la infección por *T. vivax* y una correlación positiva entre el valor de hematocrito y la condición corporal. Igualmente reportaron una correlación negativa entre la infección tripanosómica y los valores de hematocrito.



En el estudio de Morales *et al.* (2006) se observaron recuentos elevados de huevos por gramo de heces de estróngilos digestivos (hpg) en animales con condición corporal $\leq 2,5$ y el menor valor de hematocrito (31,5), lo que indica que estos animales pueden ser considerados acumuladores de parásitos o de mayor susceptibilidad, mientras que los animales con altas cargas de parásitos, buena condición corporal y hematocrito normal (34,5) serían considerados resilientes, ya que a pesar de soportar elevadas cargas parasitarias se encuentran en buenas condiciones.

En otro estudio, Agudo *et al.* (2009) reportaron valores de Hto 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.

En relación a la *Anaplasma marginale*, es común observar una prevalencia superior al 50% en rebaños bovinos del occidente del país en extendidos sanguíneos teñidos por métodos convencionales (Toro, 1990).

Mientras que, Tamasaukas *et al.* (2000, a) reportaron en dos fincas bovinas Doble Propósito (DP) en el Municipio de Santa Rita de Manapire del estado Guárico, infecciones concurrentes con otros hemotrópicos, así en la finca A: activas por *A. marginale* de 90,0% (CBC), 85% (FSC), por *Babesia spp.* (CBC) de 75,0%, 65% para *B. bigemina* y 15% para *B. bovis* (FSC), en la B, las activas por *A. marginale* fueron de 65,5% (CBC), 55,5% (FSC); para *Babesia spp.* de 45,5% (CBC), para *B. bigemina* de 28% (FSC); para *B. bovis* fue de 35% (FSC).

No hubo diferencias estadísticas significativas en cuanto a edad y sexo por explotación, detectándose la presencia de brotes agudos con estos cuatro hemotrópicos en ambas fincas, en contraste con los resultados obtenidos por Tamasaukas *et al.* (2000; a) quienes observaron valores un poco menores de prevalencia de estos hematozoarios en su estudio



en dos fincas bovinas comerciales del centro-oriente del estado Guárico, a pesar de ciertas similitudes con los valores hematológicos evaluados en ese mismo trabajo.

En tanto en el estado Monagas en bovinos cebú y mestizos *Bos taurus x Bos indicus*, se observó una prevalencia de *T. vivax* de 27% con una elevada tasa de ataque de la infección de 51% (García *et al.*, 2008).

Agudo *et al.* (2009) reportaron la prevalencia de *T. vivax* con valores de 0,83 % en fincas del estado Apure, 8,47 % en Aragua, 16,66 % en Barinas, 17,5% en Cojedes y 24,03 % en Guárico, presentándose diferencias significativas ($P < 0,05$).

En el estudio de estandarización del ELISA para el diagnóstico de *Trypanosoma* spp. en búfalos de agua, con antígenos provenientes de un aislado de *T. evansi* obtenido de un caballo con infección natural de una región endémica del llano venezolano (Bethencourt *et al.*, 2013), indicaron que, 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 fue de $37,56 \pm 0,21\%$, sin diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los valores de hematocrito en animales seropositivos y seronegativos, ni entre las tres explotaciones evaluadas.

El valor de la seroprevalencia por Ac-ELISA homóloga, fue menor que los obtenidos con otros protocolos que utilizan antígenos de *T. evansi* por su menor especificidad, así como por ser un área endémica con infecciones activas en vista de los altos valores de prevalencia y parasitemia del *T. vivax* determinados.

En el estado Carabobo se reportó una seropositividad a *T. vivax* del 39,5% utilizando la técnica de ELISA indirecta (Ac-ELISA) en rebaños bovinos de fincas localizadas en el



Municipio Juan José Mora. El antígeno, para la sensibilización de las placas de ELISA, constituyó un extracto purificado de *T. evansi*. (González y Meléndez, 2007).

En tanto que, la distribución porcentual promedio por finca de la tripanosomosis por *T. vivax*, con un promedio general para las 20 fincas muestreadas fue de 85,76%, con 52,62% y 100% como valores mínimo y máximo, respectivamente, utilizando el soporte de Ac-ELISA heterólogo con antígenos de *T. evansi*. En el estudio llevado a cabo por Agudo *et al.* (2009).

Florio-Luis *et al.* (2011) reportan la identificación de animales tripanotolerantes (TT) y tripanosusceptibles (TS) en base a marcadores fenotípicos (clínicos, parasitológicos, hematológico, serológico e inmunológico), en bovinos Criollo Limonero puros y mestizos así como mestizos *Bos taurus* x *Bos indicus* en varios estados de Venezuela, demostrando la condición de tolerancia: 100% en Criollo Limonero (n = 7), 80% en mestizos Criollos (n = 15); 84,62% en mestizos Holstein (n = 13); 72,73% mestizos Pardo Suizo (n = 11); 100% en mestizos Siboney (n = 6); 79,17% en mestizos indefinidos (n = 24) y 65,22% en mestizos Cebuínos (n = 23), siendo la primera vez que en Venezuela y en el Continente Americano, se reportan bovinos con esta condición.

Estos autores indican que se determinó diferencia significativa ($P < 0,01$) en la proporción de TT en comparación con TS dentro de una misma especie a excepción de los bovinos con predominio de *Bos indicus*. Los bovinos *Bos taurus* o mestizos con predominio *Bos taurus* muestran una condición de tripanotolerancia, coincidiendo con lo reportado por estudios africanos utilizando otras razas pertenecientes a la especie *Bos taurus* (Gachohi *et al.*, 2009; Stein, 2011). Este comportamiento hace suponer que hay una condición genética común entre las diversas razas *Bos taurus* involucradas. (Florio-Luis *et al.*, 2011).

Resaltando que, los bovinos provenientes de cruces *Bos taurus* x *Bos indicus* presentaron comportamiento variable a la condición de tripanotolerancia, coincidiendo con lo reportado por Stein (2011) y este pudiese estar relacionado de alguna manera con la proporción de



Bos taurus que pueda tener o las razas involucradas en el cruce respectivo; así como la interacción genotipo ambiente (Stein, 2011).

La Tripanotolerancia es de gran utilidad para establecer estrategias de mejoramiento genético y de preservación de las razas doble propósito en Venezuela, y así derivar programas de reproducción y selección. Hanotte *et al.* (2002) identificaron que 15 cromosomas tuvieron efecto sobre la tripanotolerancia en bovinos de razas africanas.

Contreras (1997) afirmó, que en los sistemas de producción de bovinos de doble propósito de los llanos venezolanos existe una alta heterogeneidad de unidades de producción que está influenciada por las características agroecológicas de la zona, los recursos, el impacto económico que han generado las distintas políticas aplicadas al sector agropecuario, la baja calidad del recurso fibroso para los animales y las superficies en las que estos se desarrollan.

Mientras que, Capriles y Capriles en 1994, citados por Hidalgo *et al.* (2007) comentan que la ganadería bovina doble propósito, como sistema de producción, es altamente variable donde coexisten diferentes modalidades productivas. La variación es también muy fuerte dentro y entre zonas, en las poblaciones animales, en las prácticas productivas y en las formas de gestión, acompañadas con fuertes limitantes como: la poca disponibilidad de pastos para el rebaño en las épocas críticas; las deficientes prácticas en la cría de becerros, levante de novillas y manejo del rebaño; la baja calidad sanitaria de la leche y los productos lácteos, entre otros.

Es por ello, que las diferencias encontradas en los valores de prevalencia y seroprevalencia entre Municipios pudieran atribuirse a diversos factores como, la presencia de tipo animal tripanotolerante y tripanosusceptible (en mayor o menor grado) dentro de los rebaños evaluados; entre otros factores.

Los valores encontrados de concentración de proteínas de loes extractos antigénicos especie-específicos en este estudio, fueron muy superiores a los encontrados por otros



autores, así Díaz-Araque (2010) reporta concentraciones de 9,28mg/ml para TvAA1 y de 5,6 mg/ml para TvLiem; en tanto señala que el porcentaje de recuperación de parásitos de *T. vivax*, en la purificación varió de 8 a 11,1%.

En cuanto a la concentración antigénica para los formatos de Ac-ELISA homóloga, la concentración de 20 μ g del extracto antigénico ExSCPF del *T. vivax* no presentó diferencias significativas con la de 40 μ g, por lo que la primera de ellas (20 μ g) resultó ser la cantidad de proteína antigénica especie-específica de *T. vivax* recomendada economizándose reactivos para el desarrollo de la técnica de ELISA, ya que para la Ac ELISA heteróloga con *T. evansi* se requiere de 40 μ g hasta 150 μ g de material antigénico en diversos protocolos (Reyna, 1991; Rossi, 2008).

La estandarización de un ensayo serológico es un proceso complejo y continuo, por lo que a medida que se incrementa el número de muestras de la población bajo estudio, se valida la prueba con menor variabilidad intra e inter ensayos.

En los procesos de validación, la OIE (2008) señala que, cuando haya que utilizar otros reactivos de reemplazo, tales como el antígeno para la captura del anticuerpo, los mismos deben producirse utilizando los mismos criterios que para los reactivos originales y deben probarse en al menos 5 realizaciones del ensayo utilizando un panel de sueros que se haya diseñado para ese fin.

Debe evaluarse la consistencia de los lotes de reactivos (en serie) de forma que se minimice la variabilidad del ensayo a medida que se precisen nuevos lotes. En la medida de lo posible, es importante cambiar sólo un reactivo cada vez para evitar el problema añadido de evaluar más de una variable al mismo tiempo. La variabilidad se minimiza cuando los reactivos están bien caracterizados por métodos distintos al del ensayo diana. (OIE, 2008).

En un estudio en el continente africano, Magona *et al.* (2002) compararon la técnica de Ac-ELISA con microplacas sensibilizadas con antígeno crudo desnaturalizado de *T.*



congolense y *T. vivax* (FAO/IAEA), mostrando que para el ensayo con *T. congolense* la sensibilidad fue de 63,7% y la especificidad de 57,5%, mientras que con *T. vivax* la sensibilidad y la especificidad del ensayo fue de 81,3%, respectivamente. Llevados en paralelo, los ensayos resultaron en una sensibilidad de 82,5% y la especificidad en 88,7%, respectivamente.

Los resultados obtenidos por Chacón *et al.* (2011), demostraron que existe una correlación de $r = 0,98$ entre la D.O. y la cantidad de parásitos y $r = 0,806$ entre DO y cantidad de proteínas totales de *T. evansi*; esto indica que la técnica espectrofotométrica permite cuantificar con una alta correlación la cantidad de *T. evansi*, y la cantidad de proteínas del mismo, siendo esto extrapolable a *T. vivax*. Por lo tanto, se cuantifica la cantidad de proteínas que se puede obtener de la compleja purificación de bajo rendimiento de *T. vivax*, al saber la D.O. de la muestra pudiendo ser recuperada la misma al final del proceso, mediante una técnica sencilla, rápida, de bajo costo y reproducible como lo es la espectrofotometría.

Desquesnes y Tresse (1996) señalan que en una primera estandarización, para definir el punto de corte, se puede tomar el valor arbitrario de la media de la D.O. ó definirlo como un múltiplo del valor del control negativo (ejemplo, 2,5 desviaciones estándares de la D.O. de la media de los controles negativos), más aún cuando se desconoce si la población de campo está en condición de infectada (PI) o no infectada (PNO).

Wright *et al.* (1993; 1997) recomiendan que para evitar la variación entre la reacción cromogénica, por la calidad individual de las placas, la temperatura o la actividad intrínseca de los reactivos (enzima, substrato, cromógeno), entre otros factores; el resultado debe expresarse no solo como muestras positivas, sino relacionar el valor encontrado con los controles positivos y negativos.

Este parámetro lo denominan Porcentaje Relativo de Positividad (PRP) y cuya fórmula la expresan así: PRP (%) es igual a la diferencia entre la D.O. de la muestra y la D.O. del



control negativo dividido entre la diferencia de la D.O. del control positivo y la D.O. del control negativo. (Desquesnes, 1997, a; Wright *et al.*, 1993; 1997)

Bajo estas condiciones, con las muestras de referencias fijadas, las variaciones todo el ensayo, de una placa a otra, serán insignificantes.

En tanto Wright *et al.* (1997), expresan que para la definición de un estándar de controles positivos y negativos, se requiere el recálculo de los valores de la D.O. obtenidos en los ensayos de estandarización, utilizando los análisis de regresión y correlación de los valores individuales de cada control y los valores promedios de las curvas dosis/respuesta.

Desquesnes *et al.* (2009) y Sivajothi *et al.* (2014) en sus estudios de Ac-ELISA en bovinos y ovinos, respectivamente, recomiendan que el punto de corte sea determinado por el promedio del PRP más tres desviaciones estándares.

La OIE (2008) refiere que, a efectos de información sobre los resultados del ELISA, comúnmente se utilizan los valores originales de absorbancia para calcular la repetitividad durante esta parte de la validación porque no se sabe si los resultados del suero control positivo alto, que podrían utilizarse para calcular los valores normalizados, son reproducibles en las primeras realizaciones del formato del ensayo. Además, aún no se han establecido los valores esperados para los controles.

Los coeficientes de variación (CV: desviación estándar de las réplicas dividida por la media de las réplicas), generalmente inferior al 20% para los valores de absorbancia originales de la mayoría de las muestras (muestras de titulación baja pueden tener CVs mayores), indican repetitividad adecuada en esta fase del desarrollo del ensayo.

Sin embargo, si se produce evidencia de variación excesiva (>30%) de la mayoría de las muestras en la realización del ensayo o entre las distintas realizaciones del mismo, deben llevarse a cabo más estudios preliminares para determinar si es posible la estabilización del ensayo o si debería abandonarse el formato de la prueba. Esto es importante, porque un



ensayo que es inherentemente variable tiene una gran probabilidad de no soportar el rigor de la prueba diaria de muestras procedentes de la población diana de animales.

En cuanto a los factores agroecológicos y de la producción asociados a tripanosomosis, Tamasaukas *et al.* (2000), revelaron valores de serorretores a *T. vivax* por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) de 25% y 50%, en época lluviosa, en bovinos DP de dos fincas ubicadas en el Municipio Santa Rita de Manapire del estado Guárico, con valores promedios de 33,5% en todo el oriente del estado (Tamasaukas y Roa, 1992; Tamasaukas, 1995).

Duno (1992) reportó 57,8% de seroprevalencia mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y 1% de infección activa en un muestreo de 500 bovinos de la zona noroccidental de Venezuela, y otros autores han encontrado tasas menores de seroprevalencia, pero no casos de infección activa (Suárez *et al.*, 2004), mientras que Eleizalde y Reyna-Bello (2004), mediante Ac-ELISA, determinaron 27,08% de seroprevalencia en bovinos de la misma región.

Para tripanosomosis Alfaro *et al.* (1994a, b) en su estudio de hemotrópicos, encontraron valores de serorretores a *T. vivax* por IFI, de 25% y 50%, sugiriendo una mayor susceptibilidad de los animales adultos para contraer la enfermedad, afectando de manera similar a machos y hembras en una explotación. (Toro, 1990; Rey, 2004).

En este sentido se destaca que el *T. vivax*, está ampliamente distribuido en Venezuela, teniendo una prevalencia relativamente alta en zonas ganaderas bovinas doble propósito (DP), dado que los resultados del presente trabajo reportan valores obtenidos mucho mayores que los reportados por Tamasaukas *et al.* (2002) quienes procesaron 193 sueros por inmunofluorescencia indirecta encontrando una seroprevalencia general promedio por IFI (con antígenos homólogos de *T. vivax*), para tripanosomosis por *T. vivax* de 60%, agrupándose en un 56,9% los serorretores en época lluviosa y 45,7% en época seca, en fincas de la zona alta de los Municipios Roscio y Ortiz del estado Guárico; y de un 22% en



promedio general en un estudio de la tripanosomosis en dos fincas bovinas del Municipio Santa Rita de Manapire del estado Guárico (Tamasaukas *et al.*, 2000a,b).

De igual manera en otros estados como Apure, Táchira, Barinas, Mérida y Sur del Lago de Maracaibo se han presentado problemas de hemotrópicos a nivel de la ganadería doble propósito, obteniéndose valores generales entre 20,8 al 57,8% de animales con *Trypanosoma spp.* detectados a través de exámenes serológicos (Bolívar *et al.*, 2006).

En el estado Monagas en bovinos cebú y mestizos *Bos taurus x Bos indicus*, se observó una seroprevalencia de *T. vivax* por el orden del 50,5% con una elevada tasa de ataque de la infección de 51% (García *et al.*, 2008).

En el estudio de Agudo *et al.* (2009) se obtuvo una seroprevalencia general promedio en 20 fincas de los Llanos Centrales (Apure, Aragua, Barinas, Cojedes y Guárico) de 85,76 % a través de la prueba de Ac-ELISA bajo el mismo protocolo del presente trabajo, valor muy cercano al obtenido en este trabajo que fue de 88,65%.

Mientras que, en el Municipio Pedro Camejo del estado Apure (Lis, 2010) se determinó una prevalencia del 0,81% mediante métodos parasitológicos. Mediante ELISA, la seroprevalencia fue de 34,3% (127/370). De éstos, el 10,5% (39/370) de los seropositivos eran animales menores de un año y el 23,78% (88/370) eran mayores de un año. Concluyen Sandoval *et al.* (1998) en una investigación sobre una encuesta ser epidemiológica en dos unidades agroecológicas del Valle de Aroa, Yaracuy, que obtuvieron una seroprevalencia mucho menor (38,2%) que la encontrada en el presente estudio.

Con referencia a las perspectivas en cuanto a los antígenos, se indica que, la identificación de los principales antígenos de tripanosomas, y su producción como moléculas recombinantes o péptidos sintéticos, conduce actualmente al desarrollo y validación de nuevas pruebas basadas en el empleo de moléculas definidas. Por tanto, se siguen trabajos para mejorar la especificidad y sensibilidad de las pruebas serológicas Ac-ELISA en



formato homólogo, con la producción eficiente de anticuerpos específicos de especie, y alcanzar un alto nivel de estandarización que no se logra actualmente mediante la utilización de extractos totales heterólogos de los parásitos. (OIE, 2004; Tamasaukas, 2011).

En búfalos, el comportamiento del Ac-ELISA *T. evansi* 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. (Bethencourt *et al.*, 2013).

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). 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. (Bethencourt *et al.*, 2013).

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).

Para el inmunodiagnóstico con el ELISA indirecto, se han probado extractos del tripanosoma como antígeno para detectar anticuerpos; sin embargo, los resultados no han



sido satisfactorios, requiriéndose una completa estandarización de la técnica (Greiner *et al.*, 1997; Rebeski *et al.*, 1999; Boulangé *et al.*, 2002).

Aun así constituye la mejor opción, dada la baja sensibilidad de los métodos directos convencionales y la inoperancia de la PCR o del análisis molecular proteómico para el diagnóstico de rutina.

La identificación de los principales antígenos de tripanosomas, y su producción como moléculas recombinantes o péptidos sintéticos, conduce actualmente al desarrollo y validación de nuevas pruebas basadas en el empleo de moléculas definidas. Por tanto, se siguen trabajos para mejorar la especificidad y sensibilidad de las pruebas serológicas Ac-ELISA en formato homólogo, con la producción eficiente de anticuerpos específicos de especie, y alcanzar un alto nivel de estandarización que no se logra actualmente mediante la utilización de extractos totales heterólogos de los parásitos. (OIE, 2004; Tamasaukas, 2011).

Tanto la IFI como la Ac-ELISA son pruebas de detección de anticuerpos con altos valores de sensibilidad y especificidad, aunque variables según el tipo de antígeno utilizado. Detectan respuestas inmunes a infecciones actuales y pasadas y pueden, consecuentemente, proporcionar un diagnóstico preliminar de infección activa, al determinar los títulos de anticuerpos en muestreos pareados.

Es de destacar lo reflejado por Ramírez (2013; 2015), de que la localización extracelular del tripanosoma conlleva a que la respuesta inmunitaria dominante por parte del hospedador sea humoral; es característico en las tripanosomosis bovinas, la activación policromar de células B, demostrada por el aumento en el número de células B y por los elevados niveles de IBM. Los anticuerpos producidos durante la infección pueden ser proyectivos, ya que ellos median la limpieza del parásito, la remoción de complejos inmunes y la neutralización de productos secretados por el parásito. La eliminación de complejos antígeno-anticuerpo es regulada por la activación del complemento y por la



unión de células fagocíticas, ambos procesos son dependientes del isotopo (Taylor, 1998; Hill *et al.*, 2005).

La unión mediada por anticuerpos de los tripanosomas y su posterior ingreso a las células fagocíticas, ocurre en ausencia de Complemento; el Complemento mejora la eficiencia en la remoción de parásitos y complejos inmunes. Resultados experimentales evidencian que los tripanosomas son lisados *in vitro* en presencia de anticuerpos específicos de VSG y complemento, además, ambas vías (clásica y alterna) son activadas, durante la infección, sin embargo, esto pareciera no ser un evento significativo en la tripanosomosis (Taylor, 1998).

En bovinos infectados con *T. vivax* y *T. congolense*, se ha observado una disminución en los niveles séricos del complemento hemolítico de la vía alterna y de C3 de la vía clásica, además IBM y algunas IgGs fijan complemento, IgM es más eficiente en este sentido. En ausencia de cantidades suficientes de C3, los complejos inmunes pueden persistir y conllevar a la activación policlonal de células B. Se ha demostrado que la sensibilidad de las células B para ser activadas por antígenos aumenta a través de la interacción con complejos antígeno-anticuerpo-complemento en la superficie de células dendríticas foliculares (Taylor, 1998).

La inmunidad protectora en bovinos puede ser inducida por la producción de anticuerpos específicos contra tipos de antígenos variantes que reaccionan con las glicoproteínas (VSG) de los tripanosomas (Luckins, 1992). Los anticuerpos específicos contra antígenos variantes promueven la lisis de los tripanosomas y la activación de macrófagos (Hill *et al.*, 2005).

Para el inmunodiagnóstico, el ELISA indirecto, para detectar anticuerpos utilizando extractos del tripanosoma como antígeno se han probado; sin embargo, los resultados no han sido satisfactorios, requiriéndose una completa estandarización de la técnica (Greiner *et al.*, 1997; Rebeski *et al.*, 1999; Boulangé *et al.*, 2002). Aun así constituye la mejor opción,



dada la baja sensibilidad de los métodos directos convencionales y la inoperancia de la PCR o del análisis molecular proteómico para el diagnóstico de rutina.

Interesante como futuras investigaciones para mejorar los sistemas de diagnóstico, está el análisis diferencial de las proteínas del *T.vivax* y tripanosomas en general, visto que Ramírez (2013; 2015) en su estudio presenta la clasificación de las proteínas de acuerdo a su función molecular y su función biológica, basada en sus propiedades, tales como su probable participación en la virulencia y/o patogenicidad del parásito, su posible uso como blanco terapéutico, probable utilidad en el diagnóstico o en la inmunoprotección.

Presentando como candidatos para diagnóstico (antigenicidad e inmunogenicidad): 1-Con mayor expresión en el aislado TvLIEM176, la Proteína de choque térmico 70 o HSP70 (Spots 1979, 1986); 2-Con mayor expresión en el aislado TvMT1: la Piruvato quinasa (Spot 758) y 3- Con igual expresión para ambos aislados: GADPH (Spot 1969). (Ramírez, 2013; 2015).

Siendo las HSP70 de gran importancia, ya que este grupo de proteínas constituye uno de los más conservados en todos los organismos y se encuentra localizado en una variedad de compartimientos celulares como el citoplasma, retículo endoplasmático, mitocondria y cloroplastos (Folgueira y Requena, 2007 citados por Ramírez, 2013; 2015). Particularmente en los tripanosomatídeos, los miembros de esta familia están localizados en el citoplasma (cy-hsp70), en mitocondria (mt-hsp70) y en retículo endoplasmático (grp78) (Krautz y col., 1998 citados por Ramírez, 2013; 2015).

Este hecho podría explicar que antígenos de origen citosólico y mitocondrial de tripanosoma sean los más conservados y de mayor utilidad diagnóstica en ensayos serológicos, como el observado en el presente trabajo, en el cual, los extractos solubles purificados citosólicos presentaron mejores resultados en los intra y entre ensayos de repetibilidad en laboratorio, respecto a la especificidad, sensibilidad, valores predictivos y



concordancia, aun cuando no resultaran diferencias estadísticas significativas entre los tres productos antigénicos ensayados.

En el trabajo de Bolívar (2013) cuyo propósito fue detectar en garrapatas obtenidas de bovinos de dos zonas ganaderas del estado Mérida, utilizando la metodología PCR, la presencia de ADN circulante para los hemoparásitos *A. marginale* y *T. vivax*, que permitan comprender la relación de la transmisión en las zonas de estudio, identificando el rol que como vector de hemoparásitos representa la garrapata común de ganado bovino; culmina que en sus resultados obtuvo que, los análisis parasitológicos directos a partir de hemolinfa y sangre no revelaron positividad ninguna de los microorganismos hacia los cuales se dirigió el diagnóstico.

Como parte de sus resultados, señala que, los análisis de PCR revelaron ADN parasitario circulante en un total de 106 teleoginas (37,19% de reactores a PCR), correspondiendo el 90,57% de positividad a hemoparásitos (*A. marginale* + *T. vivax*) al ADN de teleoginas recolectadas de la región de Chiguará.

En cuanto a la discriminación por especie, 84 correspondían a ADN de *A. marginale* y 22 a ADN de *T. vivax*. No se reportó ADN circulante para *T. vivax* en las garrapatas recolectadas en la localidad de Jají. (Bolívar, 2013).

Por último, indica Bolívar (2013) que son muy pocas las investigaciones que respaldan a esta transmisión para hemoflagelados del género *Trypanosoma* en particular para *T. vivax*.

En cuanto al PCR, la utilización de cebadores ITS1BR/ITS2BR y el ITS1CF/ITS2CF según Thumbi *et al.* (2008), los productos de amplificación fueron: para *T. brucei* de 480 bp, *T. congolense savannah* de 700 bp, *T. congolense kilifi* de 620 bp, *T. congolense forest* de 700 bp y para *T. vivax* de 250 bp, lo cual es coincidente con las bandas obtenidas en el PCR en este estudio de *T. congolense forest* de 710pb, *T. congolense savanah* de 700pb y *T. brucei*



de 480; en tanto las bandas observadas para *T. vivax* y extractos fueron de 210pb similar a lo obtenido por Bolívar (2013) con los cebadores TviSL1 y TviSL2.

Estudios directos de hemolinfa sugieren que elementos móviles reportados corresponderían a la especie *Trypanosoma theileri* (Sandoval *et al.*, 1995, Rodríguez-Vivas *et al.*, 2003, Martins *et al.*, 2008); por lo que, los resultados obtenidos en su investigación, permiten abrir el abanico de posibilidades para incriminar a *R. (B.) microplus* dentro de la dinámica de transmisión para estos hemoparásitos -en especial para *T.vivax* en la zona muestreada, situación en parte explicada por el enorme potencial de dispersión de las garrapatas, necesitándose de nuevos estudios que evalúen la realidad en cuanto a distribución y dinámica de comportamiento ecoepidemiológico en mayor número de muestras y diferentes áreas de explotación ganadera.

Avances significativos en estudios sobre *T. vivax* han sido realizados en los últimos años, incluyendo la publicación de secuencias genómicas, así como secuencias parciales de ARN para la cepa Y486, la cual está adaptada a roedores (Jackson *et al.*, 2012) y el análisis transcriptómico del aislado TvLIEM176 (Greif *et al.*, 2013). Ambos aislados de *T. vivax* provienen de bovinos; el aislado Y486 fue obtenido de ganado cebú en Nigeria en 1976 (Leefflang *et al.*, 1976; Gibson, 2012); mientras que TvLIEM176 proviene del estado Trujillo, Venezuela (Gomez-Piñeres *et al.*, 2014).

En *T. vivax* baja recombinación entre copias silenciosas VSG a diferencia de *T. brucei* y *T. congolense* (Jackson *et al.*, 2012; 2013).

Greif *et al.* (2013), llevaron a cabo un análisis transcriptómico de formas sanguíneas de *T. vivax*, utilizando para ello el aislado venezolano TvLIEM176; consiguieron alrededor de 6500 proteínas y secuencias codificadas por el ARN, incluyendo más de 100 especie-específicos, además de 50 genes que no habían sido previamente reportados en el GenBank, lo que indica que muy probablemente estos genes podrían ser exclusivos del aislado TvLIEM176.



El único gen de VSG que fue encontrado en el ARNm de este aislado, sorpresivamente fue muy similar (90,4 % de similitud) con el único gen de VSG reportado hasta la fecha para *T. vivax*, el cual proviene de un aislado africano de esta especie (Gardiner *et al.*, 1996).

Tavares (2013) realizó un estudio proteómico del inmunoma del aislado venezolano TvLIEM176 de *T. vivax*. Al realizar el Western blot por doble dimensión, se encontraron 18 spots de interés con masas moleculares aproximadas de 50, 55, 60, 70 y 83 kDa. Estos spots fueron evaluados por nano LC-MS/MS, lográndose la identificación de 12 proteínas. De las 12 proteínas inmunodominantes, 5 fueron catalogadas como candidatas para diagnóstico especie-específico de *T. vivax*, al no ser reconocidas por sueros de animales positivos a *T. evansi*: PFR1, PFR2, HSP60, HSP70 y HSP83.

El resto de las proteínas identificadas fueron: alfa tubulina, beta tubulina, piruvato deshidrogenasa, ATP sintetasa subunidad Beta, piruvato quinasa, enolasa y ATPasa subunidad A.

Entre las proteínas inmunogénicas de este estudio, no se evidenció la VSG, la cual pareciera no ser antigénica en *T. vivax*, coincidiendo con lo reportado por Greif *et al.* (2013) y Ramírez-Barrios *et al.* (2015).

En *T. cruzi* se conoce la importancia de los glicoconjugados (glicolípidos, proteoglicanos y glicoproteínas) en la relación parásito huésped y se han propuesto técnicas diagnósticas basadas en la detección de residuos manosídicos en sueros de pacientes chagásicos. (Haynes *et al.*, 1996).

Proteínas purificadas y caracterizadas de 32 kDa y 66 kDa de la fracción citoplasmática de un aislado de *T. vivax*, fueron reconocidas por sueros de bovino positivo a *T. vivax*, pero no por sueros de equinos infectados por *T. evansi*, concluyendo que dichas proteínas presentan



gran especificidad y que además pueden ser usadas para discriminar infecciones entre ambos parásitos. (Bolívar *et al.*, 2007)

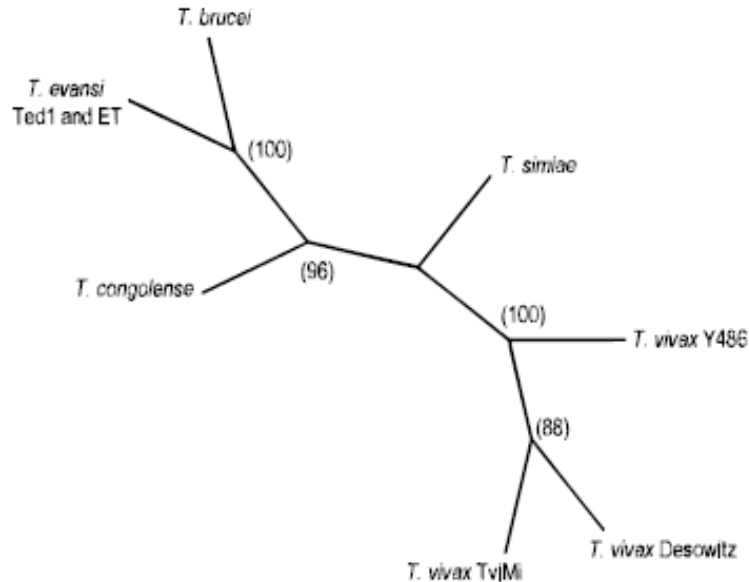
El patrón electroforético en geles de Poliacrilamida, mostrado por *T. vivax* y *T. evansi* en las diferentes fracciones (proteínas de membrana y citosólicas), demostró que la parte citosólica era donde se encontraba la mayor concentración de proteínas, revelando la presencia de bandas polipeptídicas entre los 33,9 kDa y 73 kDa con dos bandas bien diferenciadas cercanas a los 47,5 kDa (Valera, 2012).

Por su parte, Ventura *et al.* (2001) en su trabajo sobre la caracterización del gen SL (Spliced-Leader) de un stock brasileño de *T. vivax* y la detección específica de la especie mediante amplificación por PCR de una secuencia espaciadora intergénica, señalaron que, los dendrogramas basados en unidades de intrones y exones alineados fueron idénticos en todos los stocks; las secuencias de unidades de repetición del SL ARN demostraron que los exones de todos los stocks eran idénticos, y que las secuencias de los intrones con alta relación genética con el *T. vivax* de Brasil y de este africano y fueron en un 97,8%, idénticos.

Además indicaron que para la posición taxonómica del stock brasileño de *T. vivax* y poblaciones del TvMi Y486 mostraron alta identidad en general (96,5%) incluso dentro de la región intergénica (95,7%) y que en un 100% contenían secuencias de ARNr 5S idénticos. (Figura 32, tomada de Ventura *et al.*, 2001).

De acuerdo con datos anteriores sobre la filogenia de los tripanosomas Salivaria basados en secuencias de SSU rRNA (Haag *et al.*, 1988; Stevens y Gibson, 1999), el análisis de Ventura *et al.* (2001) del ARN SL utilizado posiciona al stock brasileño de *T. vivax* en los clusters o grupos africanos de *T. vivax* y *T. brucei* / *T. evansi*, respectivamente, separados de *T. congolense* y del *T. simiae* (Figura 33, tomada de Ventura *et al.*, 2001).

Figura 32. Dendrograma de distancia genética de especies de *Trypanosoma* spp Salivaria



Fuente: (figura original tomada de Ventura *et al.*, 2001)

Nota: en la que se basa la relación genética entre las poblaciones de América y África sobre el análisis de máxima verosimilitud de las secuencias de genes SL para ilustrar la relación genética del stock brasileño de *T. vivax* y el TvMi. Las amplificaciones que aparecen entre paréntesis, se refiere a los valores de arranque de los clusters o grupos en 100 réplicas.

En tanto, Cortez *et al.* (2006) discuten sobre las controversiales relaciones taxonómicas y filogenéticas del *T. vivax* americano y africano; y aunque algunos investigadores sugieren que los aislados de suramérica y los del este y oeste africano podrían ser clasificados como subespecies o especies afines a *T. vivax*.



En su estudio Cortez *et al.* (2006), compararon resultados en base a aislados de *T. vivax* suramericano (de Brasil y de Venezuela) y del este y del oeste del continente africano.

Para ello utilizaron diferentes secuencias ribosomales, SSU, SSU más 5.8S o todo el ITS ADN_r de *T. vivax* americano y africano; observando que los aislados de Brasil, Venezuela y África Occidental (Nigeria) se relacionan estrechamente, en tanto que se distancia significativamente de los aislados analizados del África Oriental (Kenia).

Los aislados brasileños provinieron de animales asintomáticos o bien con diferentes expresiones patológicas, agudas y/o crónicas, de la enfermedad.

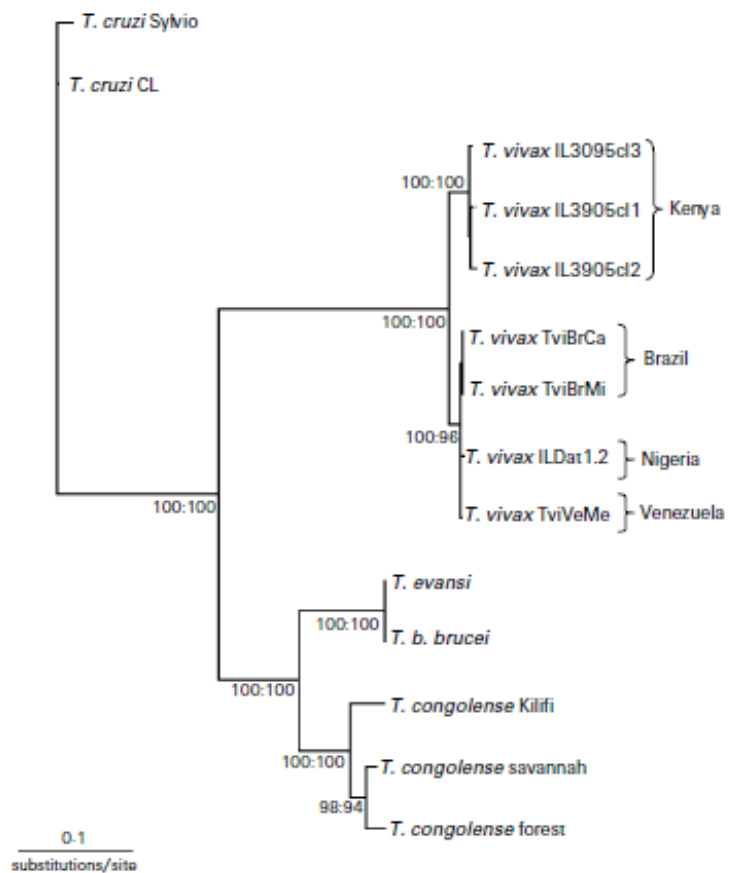
Este estudio no reveló un polimorfismo significativo para separar los aislados de África Occidental y América del Sur en diferentes especies y/o subespecies e indican que la complejidad de *T. vivax* en África y de todo el subgénero Trypanosoma (*Duttonella*) podría ser más alta que se creía anteriormente. (Figura 33, tomada de Cortez *et al.*, 2006).

Concluyen en este estudio Cortez *et al.* (2006) que se demostró la posición de los aislados de *T. vivax* como un grupo marginal del cluster Salivaria, y que los aislados suramericanos y del oeste africano están muy cercanos, en tanto los del este del África se encontraban muy separados.

La posición de *T. vivax* en los árboles filogenéticos sugiere que fue el primer taxón a divergir, por lo tanto en representación de las especies más antiguas de los Trypanosoma salivarios (Haag *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 2001; Stevens y Rambaut, 2001; Hamilton *et al.*, 2004).

Aunque todos los tripanosomas se transmiten a través de la saliva de la mosca tsetse, el ciclo de vida de *T. vivax* es distinta en que no sufre desarrollo en el intestino grueso de la mosca como los otros subgéneros, pero completa su desarrollo en su totalidad dentro de la piezas bucales (Hoare, 1972).

Figura 33. Topología del árbol filogenético basado en el análisis de máxima verosimilitud de secuencias SSU y (V7-V8+5.8S) de ADNr de aislados de *Trypanosoma vivax* y otras especies de tripanosomas Salivaria



Fuente: figura original tomada de Cortez *et al.*, 2006)



Nota: El modelo evolutivo de mejor ajuste para el análisis de probabilidad (según lo determinado por Modeltest) era Tamura y Nei con gamma. Los números en los nodos corresponden al porcentaje de los valores de arranque (Máxima Parsimonia: Máxima Verosimilitud) derivado de 100 réplicas.

En común con otros tripanosomas, el *T. vivax* muestra variación antigénica, pero de características distintas, por ejemplo, propiedades diferenciales bioquímicas y antigénicas de la variante glicoproteica de superficie (VSG), así como un menor repertorio y menos heterogéneo, del tipo de antígeno variable (VAT) (Gardiner *et al.*, 1996).

La organización cromosómica en *T. vivax* también es distinta, ya que tiene sólo 1-2 minicromosomas lo que contrasta con los 50-100 en los otros tripanosomas (Dickin y Gibson, 1989); por otra parte, *T. vivax* es predominantemente un parásito de bóvidos, presentando un menor gama de huéspedes mamíferos en comparación con *T. congolense* o *T. brucei* (Hoare, 1972; Gibson, 2002). Por lo tanto, la posición de *T. vivax* en la periferia de la rama del *T. brucei* es compatible con su distinta biológica y las características moleculares, en comparación con el resto de la tripanosomas.

En contraste con la gran distancia que separa genéticamente al *T. vivax* del este africano de todos los otros aislados de esta especie, se observó una alta homogeneidad entre los aislados de suramericanos; sin embargo, el aislamientos brasileños estaban más estrechamente relacionados entre sí, que los aislados venezolanos. (Cortez *et al.*, 2006).

Los aislados brasileños de *T. vivax* provinieron de animales infectados asintomáticos, así como de diferentes brotes agudos o de infecciones crónicas de la enfermedad.

Refieren Cortez *et al.* (2006) que los estudios mostraron que las poblaciones de *T. vivax* del este de África (Kenia) diferían en la morfología, la susceptibilidad del huésped, los patrones de isoenzimas y la virulencia de los aislados (Hoare, 1972; Murray y Clarkson, 1982; Gathuo *et al.*, 1987; Fasogbon *et al.* 1990).



Curiosamente, aislados suramericanos tenían copias altamente homogéneos de la secuencia ITS en comparación con los aislados de *T. vivax* transmitidos por la mosca tsetse africanos. También se detectaron regiones ITS altamente polimórficas en *T. congolense savannah* y divergencia significativa con los de *T. b brucei*, que se transmite de forma cíclica por la mosca tsetse, mientras que el polimorfismo no se observó en aislado brasileño de *T. evansi* que se transmite en forma mecánica. (Cortez *et al.*, 2006).

Aunque las poblaciones de *T. vivax* suramericanos y de África occidental tienen diferentes modos de transmisión (cíclica o mecánica), tienen patología similar y, como se muestra en este estudio, no se puede distinguir claramente por análisis de filogenia molecular utilizando secuencias ribosómicas. Estos datos fueron corroborados por un estudio anterior basado en el gen de secuencias SL (Ventura *et al.*, 2001).

García *et al.* (2009) en Venezuela llevó a cabo un estudio con el objetivo de efectuar una caracterización molecular de *T. vivax* en ovinos de dos hatos en los cuales estos rumiantes, conjuntamente con vacunos y búfalos de agua, comparten la misma área agroecológica, estableciendo el potencial papel de los ovinos como fuente de infección de tripanosomosis por *T. vivax* para los grandes rumiantes.

Estos investigadores, emplearon un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar la identificación de especie, mientras que un ensayo de PCR-RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción) les permitió evaluar la variabilidad intra-específica entre los aislados de *T. vivax* detectados en ovinos vs. aquellos provenientes de bóvidos (vacunos y búfalos de agua), colectados en la misma área de producción.

Como resultados, García *et al.* (2009) indican que, de las 320 muestras de sangre de ovinos colectadas, la microcentrifugación capilar detectó positividad en 11 (4,35%), lo que es de gran relevancia epidemiológica debido a la baja sensibilidad de esta metodología.



Los resultados de PCR permitieron caracterizar a *T. vivax* como la especie presente en todas las infecciones activas detectadas. Todos los animales infectados mostraron un valor de hematocrito inferior ($P < 0,05$) al registrado en animales no infectados (22,435 vs. 31,450). (García *et al.*, 2009).

El ensayo de PCR-RFLP permitió observar la existencia de perfiles de restricción similares entre los aislados de *T. vivax* evaluados, sugiriéndose la ausencia de variación intra-específica para el marcador molecular en estudio, independientemente del origen de hospedador del que provino la muestra (ovinos, vacunos, búfalos de agua). (García *et al.*, 2009).

García *et al.* (2009), sugieren, que los aislados de *T. vivax* que infectan ovinos, vacunos y búfalos de agua en el área de estudio pudiesen estar estrechamente relacionados desde un punto de vista genético y por ello, los ovinos pudiesen desempeñar un importante papel en la epidemiología de la tripanosomosis bovina en esta área de estudio, recomendándose que éstos sean incorporados en los programas terapéuticos y preventivos contra esta enfermedad.

Por análisis molecular, Bolívar *et al.* (2014) presentan en su trabajo publicado, los resultados de las evaluaciones diagnósticas, realizadas por PCR, para agentes hemotrópicos, en 67 búfalas y 11 bovinos, coexistentes, provenientes de una explotación semi-intensiva lechera localizada en el Municipio Obispo Ramos de Lora, Parroquia El Guamo, del estado Mérida.

El diagnóstico por PCR evidenció 57 bovinos (74,03%) positivos a hemotrópicos. *A. marginale* (54,54%) resultó la especie predominante en ambos ganados, en búfalas; seguida en orden decreciente por *T. theileri* (22,07%), *T. vivax* (19,48%) y *B. bigemina* (10,38%). Un solo animal (01 búfala) presentó positividad para 4 de los 5 microorganismos investigados por PCR (*T. vivax* + *T. theileri* + *A. marginale* + *B. bigemina*). (Bolívar *et al.*, 2014)



En cuanto a asociaciones, resalta en búfalas los binomios *T. vivax* + *A. marginale* y *T. theileri* + *B. bigemina*. En ningún animal hubo amplificación de ADN para *B. bovis* tanto, algunos de los ADN problema fueron ensayados por DGGE, revelando la presencia de *A. marginale* y *Mycoplasma wenyonii*; concluyen en que los resultados obtenidos corroboran la clínica presuntiva y el valor del método molecular como herramienta diagnóstica. (Bolívar *et al.*, 2014).

8. CONCLUSIONES

Los tres productos antigénicos, especie-específicos de *T. vivax* mostraron en la Ac-ELISA y en la IFI, altos grados de sensibilidad y especificidad por lo que la técnica de producción de antígenos resultó eficiente para el diagnóstico de anticuerpos anti-*T. vivax*.

El extracto antigénico ExSCPF del *T. vivax* a una concentración de 20 μ g resultó eficiente para detectar en campo, el 92% de la prevalencia serológica de la tripanosomosis por Ac ELISA homóloga; lo cual es una ventaja ya que es menor la cantidad de antígeno necesario que la requerida para los Ac ELISA heterólogos (40 μ g).

Se demostró por PCR, la especificidad de especie de los extractos antigénicos, con los controles positivos y negativos correspondientes, así como con trypanosomas africanos, que tienen distancias filogenéticas comprobadas y ausentes en el continente americano.

La Ac-ELISA homóloga desarrollada mostró ser robusta visto los datos de repetibilidad/reproducibilidad así como los de estandarización de la misma, lo cual le otorga un valor para ser utilizada en la producción de estuches en serie industrial.

Los valores de reproducibilidad fueron mayores que los de repetibilidad, lo cual pudo deberse a diferencias entre operadores, aunque es necesario determinar los valores de promedios y rangos a fin de descomponer la variabilidad del sistema en sus componentes.



Los valores de seroprevalencia en Ac ELISA homóloga son variables, requieren de validaciones inter e intra-ensayos y para la determinación de los puntos de corte

Los valores hematológicos obtenidos evidencia anemia, esta puede ser atribuida a los hemotrópicos y a deficiencias nutricionales.

La prevalencia de *Trypanosoma vivax* por encima del 20% evidencia una situación endémica de importancia sanitaria y más cuando se muestra en frotis sanguíneos.

Comparar los resultados del método directo y del diagnóstico serológico permitió evaluar la condición epidemiológica de la tripanosomosis por *T. vivax* en las regiones bajo estudio.

La actividad de acompañamiento técnico y formación en la comunidad se llevó a cabo de manera satisfactoria, lográndose la participación activa e interés de los productores y productoras; así como la articulación de diversas instituciones.

Agradecimientos y Financiamiento

Por el apoyo en la ejecución de tareas, se agradece el apoyo de todo el personal del Laboratorio de Biotecnología, Investigación y Prestación de Servicios en Sanidad Animal (LABIPRESAN) en la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Centrales Rómulo Gallegos en San Juan de los Morros, estado Guárico; y a que se dispuso todo el soporte de infraestructura, equipamiento y dotación; así como colaboración de otros entes (Laboratorio de Investigación en Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, IVIC, INIA, Empresa Socialista Ganadera Santos Luzardo, Unidad Territorial del Ministerio del Poder Popular para la Educación Universitaria, Ciencia y Tecnología - Fundacite Aragua, Redes Socialistas de Innovación Productiva de Ganadería y Lácteos del estado Aragua, Centro Técnico Productivo Socialista Florentino, INIA, entre otros).



A los propietarios de las fincas privadas en las que se desarrollaron muestreos en sus animales.

Al Laboratorio de Referencia Serológico, Unité de Recherche sur les Bases Biologiques de la Lutte Intégrée (URBIO) del Centre international de recherche-développement sur l'élevage en zone subhumide (CIRDES), en Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, África, por la donación del material antigénico de los trypanosomas, así como el soporte y apoyo en la fase de entrenamiento y compartir saberes.

Por compartir todos sus saberes, mantener intercambio científico tecnológico y su valiosa amistad personal y acompañamiento en forma permanente, agradezco a: Dr. Zacarías Bengaly, al Dr. Isa Sidibé, al Dr. Mamadou L. Dia y todo el personal técnico y de apoyo del CIRDES; al Dr. Marc Desquesnes del CIRAD, al Dr. Louis Touratier Secretario General del Grupo ad hoc en Tripanosomosis No Transmitidas por la mosca Tse-tsé (ad hoc Group on Non Transmitted Animal Trypanosomoses) de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), al Dr. Pedro María Aso, y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron con el presente trabajo doctoral y mi formación continua.

A la Dra. Trina Perrone† por su apoyo incondicional.

Al FONACIT, por el cofinanciamiento a través de los Proyectos PEII No. 2012001380, 2012001553 y 2012001789.

Al INIA por el cofinanciamiento a través del Proyecto INIA-EMBRAPA.

A la UNERG por el cofinanciamiento.

A mis tutores de Maestría MV Leonel Agudo Castellanos, Ing Agr PA Alba Silva Ravelo, Ing Agr PA Josefina Sánchez, Ing Agr PV Jesús Ron, Ing Agr María Mendoza, a mis colaboradoras Ing Agr Mary Marichales, a mis compañeras de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela MV María Elena García, Ing Agr PA



Aixa Aguirre y demás trabajadores; a mis tutorados de Doctorado Ing Agr MSc Jazmín Florio de Pineda, Ing Agr MSc Douglas León e Ing Agr Maureen Reyes.

A mi familia y amistades por todo el apoyo y colaboración; en especial a mi Tutor Dr. Sergio Rivera, perseverante amigo y a mi estimado Comité Asesor, con gran aprecio y reconocimiento a la Dra. Margarita Cobo, amiga, maestra, ejemplo de mujer trabajadora y solidaria, al Dr. Francisco Angulo, al Dr. Héctor Ruíz y al Dr. Fernando Rivera, por sus asesorías, amistad y acompañamiento en esta Tesis Doctoral.

A mis amigos Ing Agr César Molina, Ing Agr Roberts Rodríguez, Ing Agr Rafael Pérez y demás trabajadores de la ESG Santos Luzardo por su especial apoyo y amistad.

En fin, mi sincero Agradecimiento y Reconocimiento, a todos y a todas, quienes de una u otra manera me apoyaron en este rudo camino.

9. BIBLIOGRAFÍA

AGUDELO, MT; MOGOLLÓN, JD; TORRES, LE; PEÑA, NE; BARRERA, J. 1984. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de Villavicencio, por pruebas parasitológicas directas y por inmunofluorescencia indirecta. *Rev. ICA*. 19 (1): 33-37.

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. I: Identificación y caracterización fenotípica. *REDVET. Rev. Electrón. Vet.* <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n101009.html>

ALFARO, C; GARCÍA, F; TORO, M; VALLE, A; COA, P. 1994 a. Distribución de la anaplasmosis bovina en diferentes zonas del estado Monagas. En *Memorias, VIII Congreso Venezolano de Zootecnia*. San Juan de Los Morros, Venezuela. sp.



- ALFARO, C; GARCÍA, F; TORO, M; VALLE, A. 1994 b. Prevalencia de anaplasmosis bovina de acuerdo a factores intrínsecos del hospedador en bovinos del estado Monagas. En *Memorias VIII Congreso Venezolano de Zootecnia*. San Juan de Los Morros, Venezuela. Sp.
- ALFARO, C; CLAVIJO, A, ROLO, M; GODOY, S; ARANGUREN, Y. 2008. Caracterización sanitaria de sistemas bovinos doble propósito en los Llanos de Monagas, Venezuela. *Rev Cient.*18 (Supl. 1):500.
- AÑEZ, N; BOLÍVAR, AM; CRISANTE, G; AÑEZ-ROJAS, N. 2007. *Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de tripanosomiasis y anaplasmosis en muestras de sangre de animales domésticos*. En: Taller Teórico-Práctico Utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el Diagnóstico de Tripanosomiasis y Anaplasmosis en Muestras de Sangre de Animales Domésticos. Santa Bárbara del Zulia, estado Zulia, 26 -29 de junio 2007. Néstor Añez; Gladys Crisante y Víctor E. Márquez (Eds.). www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/38698/1/curso_unesur.pdf
- ARIAS L. 1983. *Identificación y clasificación de los sistemas de producción en la zona de depresión del Unare, estado Guárico*. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Serie C, N° 2 – 07. Maracay, Venezuela.
- ARIAS, I, RIVIERA, J. 1978. *Caracterización agroclimática de la región oriental del Guárico. Diagnóstico regional*. Boletín N° 2. FONAIAP, Est. Exp. Nororiente Guárico, 200 pp.
- AUTHIE, E; MUTELI, DK; WILLIAMS, DJL. 1993. Antibody responses to invariant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to tripanosomiasis. *Parasite Immun.* 15: 101-111.
- AZPURÚA, M. 1989. *La cartografía y su contribución en la formulación de programas y proyectos agrícolas. Estudios de casos*. Programa de lagunas sur de Aragua. s/p.
- BALDIZÁN, A. 2004. *Uso del bosque seco tropical con fines de alimentación animal. Tesis Doctoral*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela: 225 pp.



- BOLÍVAR, AM; REYNA-BELLO, A; GARCÍA, F; GARCÍA-LUGO, P; CRISANTE, G; ROJAS, A; TEIXEIRA, MGMT; AÑEZ, N. 2006. Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* em bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. *Bol. Malar Salud Amb.* 46(1): 87-90.
- BOLÍVAR, AM; ROJAS, AV; ROSALES, D; TORRES, Y; GARCÍA, PJ. 2014. Detección de agentes hemotrópicos en una explotación ganadera utilizando PCR y DGGE. *Rev. Salud Animal.* 36 (1): 53-57
- BOLÍVAR, AM; REYNA-BELLO, A; GARCÍA, F; GARCÍA-LUGO, P; CRISANTE, G; ROJAS, A; AÑEZ, N. 2007. Uso de proteínas como alternativa diagnóstica para discriminar infecciones entre *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*. *Bol. Malar Salud Amb.* 47(1):83-86.
- BOLÍVAR, AM. 2013. Detección de *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma vivax* en garrapatas de ganado bovino empleando la reacción en cadena de la polimerasa. *REDVET Rev. electrón. vet.* 14 (3): <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030313.html>
- BOULANGÉ, A; KATENDE, J; AUTHIÉ, E. 2002. *Trypanosoma congolense*: Expression of a Heat Shock Protein 70 and initial evaluation as a diagnostic antigen for bovine trypanosomosis. *Exp. Parasitol.* 100: 6-11.
- CADIOLI, FA; BARNABÉ, PA; MACHADO, RZ; TEIXEIRA, MC; ANDRÉ, MR. 2012. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 21:118-124.
- CAMUS, E. 1992. Trypanosomes animales non transmises par les glossines: aspects cliniques et impact économique. En: *I Intern. Seminar on Non-Tsetse Transmitted Animal Trypanosomoses*. (October 14-16, 1992; Annecy, France): 24.
- CASADO, C. 2001. Incorporación del bosque deciduo en la alimentación de bovinos en los llanos centrales de Venezuela. *Tesis Pregrado*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay, Venezuela.: 42 pp.
- CHACÓN-GÓMEZ, Y; TAVARES-MARQUES, L; REYNA-BELLO, A. 2011. Determinacion de la correlacion entre densidad optica, numero de parásitos y concentración proteica de *Trypanosoma evansi* purificados. En: Libro de



- Resúmenes ASOVAC. LXI Convención Anual de la ASOVAC, Maracay-Venezuela, 2011: 73.
- CIP-UPWARD. 2003. Conservación y uso sostenible de la biodiversidad agrícola. Libro de Consulta. Entendiendo la diversidad agrícola. Tomo I. Centro Internacional de la Papa-Perspectivas de los Usuarios con la Investigación y el Desarrollo Agrícola. Los Baños, Laguna, Filipinas. 3 Tomos: 136.
- CLARKSON, MJ; AWAN, MAQ. 1969. The immune response of sheep to *Trypanosoma vivax*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 63 (4):. 515-527.
- CONTRERAS, A. 1997. Estudio técnico económico del sistema de producción con bovinos de doble propósito integrado al cultivo de cereales en la cuenca del río Unare. *Tesis de Maestría*. Universidad Central de Venezuela. Facultades de Agronomía y Ciencias Veterinarias. Maracay, Venezuela.
- CORTEZ, AP; VENTURA, RM, RODRÍGUES, AC; BATISTA, JS; PAIVA, F; AÑEZ, N; MACHADO, RZ; GIBSON, WC; TEIXEIRA, MMG. 2006. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitol.* 133(2): 159-169.
- DAR, FK; PARIS, J. 1973. Serological studies on trypanosomosis in East Africa. IV: Comparison of antigenic types of *Trypanosoma vivax* group organisms. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 67(3): 319-329.
- DE ALMEIDA, P; NDAO, M; VAN MEIRVENNE, N; GEERTS, S. 1997. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Acta Trop.* 66 (1):45-50.
- DE GEE, ALW; SHAH, SD; DOYLE, JJ. 1979. *Trypanosoma vivax*: sequence of antigenic variants in mice and goats. *Exp. Parasitol.* 48: 352-358.
- 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.



- DESQUESNES, M. 1997. Propositions pour la standardisation et l'interprétation des ELISA-indirectes (indirect enzyme-linked immunosorbent assay). *Rev. Sci. tech. Off. int. Epiz.* 16, 809-823.
- DESQUESNES, M. 2004. *Trypanosomes. Livestock trypanosomes and their vectors in Latin America*. Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)/Élevage et Médecine Vétérinaire Tropical (EMVT). OIE. Paris. 174pp.
- DESQUESNES, M; GARDINER, P. 1993. Epidemiologie de la trypanosomose bovine (*Trypanosoma vivax*) en Guyane française. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 46(3):463-470.
- DESQUESNES, M; TRESSE, L. 1996. Characteristics and interpretation of indirect-ELISA for *T.vivax*; proposal for standardization of results. En *Proceedings of First Symposium on New World Trypanosomes*; 20-22 November 1996, Georgetown, Guyana ; 87-94.
- DESQUESNES, M; KAMYINGKIRD, K; PRUVOT, M; KENGRADOMKIJ, CH; 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. http://www.google.co.ve/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CDYQFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fprofile%2FMathieu_Pruvot%2Fpublication%2F26248755_Antibody-ELISA_for_Trypanosoma_evansi_application_in_a_serological_survey_of_dairy_cattle_Thailand_and_validation_of_a_locally_produced_antigen%2Flinks%2F00463530cc755ea1ab000000.pdf&ei=r0I0VaneMYONNuC6gKgb&usg=AFQjCNFSh0LkXqjgnZc9ClfzbP904Hkw4A&sig2=aCfG0c-aPxNSZXtK0-GwTw
- DÍAZ-ARAQUE, MAC. 2010. Estudio comparativo de la actividad de cisteín-proteasa en aislados de venezolanos de *Trypanosoma vivax*. *Trabajo de Grado.* : 70pp.
- DICKIN, SK; GIBSON, WC. 1989. Hybridization with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosomes in *Trypanosoma vivax*. *Mol Bioch Parasitol* 33: 135–142.



- D'ETEREN, G, AUTHIE, E; WISSOCQ, N; MURRAY, YM. 1998. Trypanotolerance, and option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomiasis. *Rev. Sci. Tech.* 17 (1): 154 – 175.
- DIFFLEY, P; SCOTT, JO. 1984. Immunological control of chronic *Trypanosoma brucei* gambiense in outbred rodents. *Acta Trop.* 41: 335-342.
- DIRIE, M; OTTE, M; THATTHI, R; GARDINER, P. 1993. Comparative studies of *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* isolates from Colombia. *Parasitol.* 106:21-29.
- DUNO, F. 1992. Prevalencia de la tripanosomosis bovina en la región nor-oriental del estado Falcón. *Tesis de Maestría*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. 135pp.
- EISLER, MC; LESSARD, P; PEREGRINE, AS; MASAKE, RA; MOLOO, SK.1998. Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Vet. Parasitol.* 79:187-201.
- ELEIZALDE, M; REYNA-BELLO, A. 2004. Seroprevalencia de anaplasmosis y tripanosomosis en bovinos. *Memorias del I Simposio Internacional Hemotrópicos y sus vectores*. Caracas, Octubre 2004. 66pp.
- ESPINOZA, E. 1990. Técnicas de inmuno-fluorescencia indirecta (IFI) en el diagnóstico de la tripanosomiasis bovina. En *Hemoparásitos: biología y diagnóstico. Manual de laboratorio*. S. Giardina y F. García (Eds.). Colección Cuadernos Universidad Simón Bolívar. Serie Biología/No. 1. : 157-167.
- ESPINOZA, E; TORTOLERO, E. 1990. Un método simple de conservación de *Trypanosoma vivax* para su uso en infecciones experimentales. En *Hemoparásitos: biología y diagnóstico. Manual de laboratorio*. S. Giardina y F. García (Eds.). Colección Cuadernos Universidad Simón Bolívar. Serie Biología/No. 1. : 149-154.
- ESPINOZA, E; GONZÁLEZ, N; ASO, P; PERRONE, T. 1999. Incidencia serológica de *Trypanosoma vivax* en becerros a pastoreo en sabanas del estado Guárico. *Vet Trop.* 24(1): 5-15.
- ESPINOZA, F; PLAZA, N; DÍAZ, Y; PALMA, J; ALDEROVICH, L; ARAGORT, W; BRACAMONTE, M; CANDELO, N; CARRILLO, C; GUILLÉN, A; HIDALGO, V; LEÓN, E; MIRELES, M; MOLINA, M; MORALES, G; OBANDO, C; PÉREZ,



- N; PINO, L; ROA, N. 2006. Situación de la ganadería doble propósito en la altiplanicie de los llanos centrales. En *III Jornadas Nacionales de Actualización en Producción de Leche*. Univ. Centroocc. Lisandro Alvarado, CD ROM. Barquisimeto, Venezuela.
- EWELL, J; MADRIZ, A. 1968. *Zonas de vida de Venezuela. Memorias explicativas ecológicas sobre un mapa*. Ministerio de Agricultura y Cría, Caracas, Venezuela: 89 – 120.
- FASOGBON, AI; KNOWLES, G; GARDINER, PR. 1990. A comparison of the isoenzymes of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* isolates from East and West Africa. *Intern J Parasitol.* 20, 389–394.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 2007. *The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture*. Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling (Eds.). Rome: 542pp.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS). 2008. *Informe Pecuario*. FAO (Ed.). Roma, Italia. 92pp.
- FAO/IAEA (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY). 1998. Trypanosomosis enzyme immunoassay for detection of bovine serum antibodies: bench Protocol version iTAB Prototype 1.0.
- FLORIO, J; VACCARO, L; PÉREZ, A; MEJÍAS, H. 1998. Errores de predicción de la producción de leche por lactancia a partir de pesajes a distintos intervalos de tiempo en vacas de doble propósito. En *LRRD*. Vol. 10, N° 1 January. 1998. <http://www.lrrd.org/lrdd10/1/luci101.htm>
- FLORIO-LUIS, J; TAMASAUKAS, R; AGUDO, L. 2011. La trypanotolerancia en ganadería bovina en la República Bolivariana de Venezuela: énfasis en bovinos criollos. *AICA* 1 304-308
- FLORIO-LUIS, J; TAMASAUKAS, R; RIVERA, S. 2012. Diagnóstico participativo de hemotrópicos en bovinos a nivel de pequeños productores y productoras de ganadería doble propósito en el sur del estado Aragua en la República Bolivariana de Venezuela. *AICA*. 2: 163-170.



http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/articulos/2012/Trabaj_o027_AICA2012.pdf

- GACHOHI, J; BETT, B; MURILLA, G. 2009. Factors influencing the prevalence of trypanosomosis in Orma Boran (trypanotolerant) and Teso zebu (trypanosusceptible) cattle crosses in Teso District, western Kenya. *LRRD*. 21(12). <http://www.lrrd.org/lrrd21/12/gach21216.htm>
- GALIZA, GJ; GARCÍA, HA; ASSIS, AC; OLIVEIRA, DM; PIMENTEL, LA; DANTAS, AF; SIMÕES, SV; TEIXEIRA, MM; 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, S; MENCHO, J; GUERRA, Y; MARÍN, E; VALE, M. 2005. Correspondencia entre el color de la mucosa conjuntival y el eritrograma en vacas mestizas. *Rev. Electrón. Vet. REDVET*. SIN 1695-7504; 6 (6). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/no60605html>.
- GARCÍA, H; RIVAS, R; CONTRERAS, A; GARCÍA, I; GARCÍA, ME; GARCÍA, F.; PERRONE, T. 2009. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela. *Rev. Cient.* 19 (3): 230-237.
- GARCÍA, F; ALFARO, C; REYNA, A; CORONEL, R; RANGEL, A. 2008. Caracterización de un brote de Tripanosomosis en un rebaño bovino de ceba del estado Monagas. *Rev. Cient.* 18 (1):503. S-23.
- GARDINER, PR; JONES, TW; CUNNINGHAM, I. 1980. Antigenic analysis by immunofluorescence of in vitro-produced metacyclics of *Trypanosoma brucei* and their infections in mice. *J. Protozool.* 27 (3): 316-320.
- GARDINER, PR, NENE, V; BARRY, MM; THATTHI, R; BURLEIGH, B; CLARKE, MW. 1996. Characterization of a small variable surface glycoprotein from *Trypanosoma vivax*. *Mol Bioch Parasitol.* 82: 1-11.



- GATHUO, HK; NANTULYA, VM; GARDINER, PR. 1987. *Trypanosoma vivax*: adaptation of two East African stocks to laboratory rodents. *J. Protozool.* 34: 48–53.
- GIBSON, W. 2002. Epidemiology and diagnosis of African trypanosomiasis using DNA probes. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 96: S141–S143.
- GIBSON, W. 2012. The origins of the trypanosome genome strains *Trypanosoma brucei brucei* TREU 927, *T. b. gambiense* DAL 972, *T. vivax* Y486 and *T. congolense* IL3000. *Parasit. Vectors* 5: 71-76
- GÓMEZ DE LA CÁMARA, AG. 1998. Caracterización de pruebas diagnósticas. Idepsa 98. : 4872-4877.
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/censenanza/spiii/spiii/gomez.pdf>
- GÓMEZ, N; RIERA, A; SÁNCHEZ, A; ARIAS, L. 1982. *Diagnóstico agroecológico del Estado Guárico*. CIALLARCEN. Serie C. N°. 1-07. Calabozo, Venezuela. 36p.
- GÓMEZ-PIÑERES, E; TAVARES-MARQUES, L; REYNA-BELLO, A. 2009. Tiempo de supervivencia *in vivo* y criopreservación de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Cient.* 19 (3): 225-229.
- GOMEZ-PIÑERES, E; BOADA-SUCRE, A; BRETANA, A; CONTRERAS-BRETANA, M; GARCIA, F; REYNA-BELLO, A. 2014. Morfometría comparativa de cinco aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Fac. Cs. Vets. Univ Central Vzla.* 55(1): 25-33.
- GONZÁLEZ, LE; GARCÍA, JA; NÚÑEZ, C; PERRONE, TM; GONZÁLEZ-BARADAT, B; GONZATTI, MI; REYNA-BELLO A. 2005. *Trypanosoma vivax*: A novel method for purification from experimentally infected sheep blood. *Exp Parasitol.* 111: 126–129.
https://www.researchgate.net/profile/Mary_Isabel_Gonzatti/publication/7720457_Trypanosoma_vivax_A_novel_method_for_purification_from_experimentally_infected_sheep_blood/links/00b4951df030ccb46d000000.pdf?origin=publication_detail
- GONZÁLEZ, JR.; MELÉNDEZ, R. 2007. Seroprevalencia de la tripanosomosis y anaplasmosis bovina en el Municipio Juan José Mora del estado Carabobo, Venezuela, mediante la técnica de ELISA. *Rev Cient.* 17 (5):449-455.



- GRAB, DJ, BWAYO, JJ. 1982. Isopycnic isolation of african trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. *Acta Trop.* 39: 363-366.
- GREIF, G; PONCE DE LEON, M; LAMOLLE, G; RODRIGUEZ, M; PINEYRO, D; TAVARES-MARQUES, LM; REYNA-BELLO, A; ROBELLO, C; ALVAREZ-VALIN, F. 2013. Transcriptome analysis of the bloodstream stage from the parasite *Trypanosoma vivax*. *BMC Genomics.* 14: 149. doi:10.1186/1471-2164-14-149
- GREINER, M; KUMAR, S; KYESWA, C. 1997. Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. *Vet. Parasitol.* 79: 197-205.
- HAGG, J; O'HUIGIN, C; OVERATH, P. 1998. The molecular phylogeny of trypanosomes: Evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol. Bioch. Parasitol.* 91:37-39.
- HAMILTON, PB; STEVENS, JR; GAUNT, MW; GIDLEY, J; GIBSON, WC. 2004. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Internl J Parasitol.* 34: 1393–1404.
- HANOTTE, O; RONIN, Y; AGABA, M; NILSSON, P; GELHAUS, A; HORSTMANN, R.; SUGIMOTO, Y; KEMP, S.; GIBSON, J; KOROL, A; SOLLER, M; TEALE, YA. 2002. Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant West African N'Dama and susceptible East Boran cattle. *PNAS.* 100 (13): 7443 - 7448.
- HARRISON, RG; TODD, P; RUDGE, S; PETRIDES, DP. 2003. *Bioseparations Science and Engineering.* Oxford University Press. ISBN 978-0-19-512340-1. Electronic ISBN 978-1-62870-161-6.
- HAYNES, PA; RUSSELL, DG; CROSS, GAM. 1996. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein Gp72. *J Cell Sci.* 109, 2979-2988.
- HIDALGO, V, DOMÍNGUEZ, C, DÍAZ, Y, ESPINOZA, F, MIRELES, M. 2007. Caracterización cronológica de la ganadería vacuna de doble propósito en el nororiente del estado Guárico. En *I Simposio: Tecnologías apropiadas para la ganadería de los llanos de Venezuela.* s/i



- HILL, EW; O'GORMAN, G; AGABA, M; GIBSON, J; HANOTTE, O; KEMP, S; NAESSENS, J; COUSSENS, P; MACHUGH, D. 2005. Understanding bovine trypanosomiasis and trypanotolerance: the promise of functional genomics. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105: 247-258.
- HOARE, CA. 1972. *The Trypanosomes of Mammals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 768pp.
- JACOBSON, RH, 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17, 469-486.
- JACKSON, AP; BERRY, A; ASLETT, M; ALLISON, HC; BURTON, P; VAVROVA-ANDERSON, J; BROWN, R; BROWNE, H; CORTON, N; HAUSER, H; GAMBLE, J; GILDERTHORP, R; MARCELLO, L; MCQUILLAN, J; OTTO, TD; QUAIL, MA; SANDERS, MJ; VAN TONDER, A; GINGER, ML; FIELD, MC; BARRY, JD; HERTZ-FOWLER, C; BERRIMAN, M. 2012. Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109(9): 3416-3421.
- JAMES, MA, CORONADO, A, LÓPEZ, W, MELÉNDEZ, R, RISTIC, M. 1985. Seroepidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Venezuela. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 17: 8-9.
- JONES, TW, CLARKSON, MJ. 1972. The effect of syringe and cyclical passage on antigenic variants of *Trypanosoma vivax*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 66 (3): 303-312.
- KAAYA, GP, VALLI, VEO, MAXIE, MG, LOSOS, GJ. 1979. Inhibition of bovine bone marrow granulocyte/macrophage colony formation in vitro by serum collected from cattle infected with *Trypanosoma vivax* or *Trypanosoma congolense*. *Tropenmed. Parasitol.* 30: 230-235.
- KATENDE, JM; NANTULYA, VM. y MUSOKE, A. J. 1987. A new method for fixation and preservation of Trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescent antibody test for diagnosis, of bovine trypanosomiasis. *Trop. Med. Parasitol.* 38: 41-44.



- LANHAM, SM; GODFREY, DG. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28: 521-534.
- LEEFLANG, P; BUYS, J; BLOTKAMP, C. 1976. Studies on *Trypanosoma vivax*: infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. *Int. J. Parasitol.* 6: 413-417.
- LISS., LF. 2010. *Seroprevalencia de tripanosomosis en rebaños bovinos del municipio Pedro Camejo, Estado Apure*. FONACIT. 60pp.
- LLAMOSA, LE, MEZA, L; BOTERO, M. 2007. Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025 *Scientia et Technica* Año XIII, No. 35, Agosto de 2007. Universidad Tecnológica de Pereira. ISSN 0122-1701.
- LUCKINS, AG. 1987. Parasitological diagnosis of trypanosome infections. En: *Curso de Ampliación de Conocimientos. Postgrado en Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela*. Maracay, Venezuela. (Mimeo): 10pp
- LUCKINS, AG. 1992. Trypanosomosis in small ruminants-a major constraint to livestock production?. *Br. Vet. J.* 148: 471-472.
- LUMSDEN, WHR. 1977. Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 57 (4-5): 361-368.
- LUMSDEN, WHR; KIMBER, CD; STRANGE, M. 1977. Trypanosome populations and infections. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 71 (5): 421-424.
- MADRUGA, CR, MARQUES, APC, LEAL, CRB, CARVALHO, CME, ARAÚJO, FR, KESSLER, RH 2000. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against *Anaplasma marginale*. *Pesq Vet Bras* 20: 109-112.
- MADRUGA, CR; ARAÚJO, FR, CAVALCANTE-GIES, G; MARTINS, CH; PFEIFER, IB; RIBEIRO, LR; KESSLER, RH; SOARES, CO; MIGUITA, M, MELO, EPS, ALMEIDA, RFC; LIMA, MMSC. 2006. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101(7): 801-807.



- MAGONA, JW; MAYENDE, JSP, WALUBENGO, J. 2002. Comparative evaluation of the antibody-detection ELISA technique using microplates precoated with denatured crude antigens from *Trypanosoma congolense* or *Trypanosoma vivax*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 34 (4): 295-308.
<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1015630701923>
- MARTÍNEZ, N; HERRERA, P; BIRBE, B; DOMÍNGUEZ, C. 1998. Relación entre la condición corporal y la respuesta reproductiva de hembras bovinas de doble propósito. En *Mejora de la ganadería mestiza de doble propósito*. Madriz, N.; Soto, E. (Eds.). Ediciones Astro Data S. A., Maracaibo, Venezuela. Pp: 398-412.
- MARTINS J; LEITE, R; DOYLE, R. 2008. Tripanosomatides like *Trypanosomatheileri* in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 17(2):113-4.
- MASAKE, RA; MINJA, SH. 1995. Ag-ELISAs for trypanosomes. Antigen-ELISA for detection of trypanosomes..
http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/Ag_Elisa/masake.htm
- MASAKE, RA; MOLOO, SK; NANTULYA, VM; MINJA, SH; MAKAU, JM; NJUGUNA, JT. 1995. Comparative sensitivity of antigen-detection enzyme immunosorbent assay and microhaematocrit centrifugation technique in the diagnosis of *Trypanosoma brucei* infections in cattle. *Vet. Parasitol.* 56:37-46.
- MASAKE, RA; MAJIWA, PAO; MOLOO, SK, MAKAU, JM; NJUGUNA, JT; MAINA, M; KABATA, J; OLE-MOIYOI, OK; NANTULYA, VM. 1997. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Exp. Parasitol.* 85(2):193-205.
- MATEUS, G; GARCÍA, O; LEÓN, J. 1992. Use of trypanidium in an integrated control method of *Trypanosoma vivax* in Colombia. En *I International Seminar on Non-Tsetse Transmitted Animal Trypanosomoses*. (14-16 Oct., 1.992; Annecy, France):. 90.
- MATTIOLI, RC; FAYE, JA. 1996. A comparative study of the parasitological buffy coat technique and an antigen enzyme immunoassay for trypanosome diagnosis in sequential *Trypanosoma congolense* infections in N'Dama, Gobra zebu and N'Dama x Gobra crossed cattle. *Acta Trop.* 62:71-81.



- MCDERMOTT, J; 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.
- MEIVERNNE, NV. 1996. Antibody detection tests for diagnosis of African trypanosomosis. Antigen ELISAs for trypanosomes. Evaluation performance. En *Proceedings of a Workshop Held at ILRI, Nairobi, Kenya*: 105-106.
- MINISTERIO DEL AMBIENTE Y DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES (MARNR). 1979. *Inventario nacional de tierras llanos centro-occidentales. Serie informes científicos. Zona 2/IC/22, Maracay, estado Aragua, Venezuela.* 150 p.
- MIRELES, M. 2003. *Proyecto INIA: Aumento de la productividad agrícola en la comunidad Las Peñitas al sur de Aragua. Informe final.* s/p.
- MOGOLLÓN, L; COMERMA, J. 1994. *Suelos de Venezuela.* Palmaven, PDVSA, Caracas, Venezuela, 313 pp.
- MOLOO, SK; LOSOS, GJ; KUTUZA, SB. 1973. Transmission of *Trypanosoma brucei* to cats and dogs by feeding on infected goats. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 67 (3):. 331-334.
- MORALES, G; PINO, L; SANDOVAL, E; FLORIO, J; JIMÉNEZ, D. 2006. Niveles de infestación parasitaria, condición corporal y valores de hematocrito en bovinos resistentes, resilientes y acumuladores de parásitos en un rebaño Criollo Río Limón. *Zootecnia Trop.* 24 (3):333-346. http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt2403/arti/morales_g.htm
- MORLAIS, I; RAVEL, S; GRÉBAUT, P; DUMAS, V; CUNY, G. 2001. New molecular marker for *Trypanosoma* (*Duttonella*) *vivax* identification. *Acta Trop.* 80(3):207-13.
- MÜRPHY, N. 1995. Redefinición de los frentes de batalla contra la tripanosomiasis. In: *Investigación pecuaria para el desarrollo. Boletín del Instituto Internacional de Investigaciones Pecuarias (ILRI).* Vol. 1 (1):11-12.
- MÜRPHY, NB; PELLÉ, R. 1997. Differential gene expression during the life cycle of trypanosomes. En *Proceedings of the first internet conference on Salivarian trypanosomes* (FAO animal production and health paper 136). Tryplink-L



- discussion list 9-14 December 1996. Roberto Aguilar M.S. Silva Alberto M.R. Dávila (Eds.). <http://www.fao.org/docrep/W5781E/W5781E00.htm>
- MURRAY, A K; CLARKSON, MJ. 1982. Characterization of stocks of *Trypanosoma vivax*. II. Immunological studies. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 76: 283–292.
- MURRAY, M; TRAIL, J; TURNER, D; WISSOCQ, Y. 1983. Productivity and Trypanotolerance. <http://www.ilri.org/InfoServ/Webpub/Fulldocs/LivProd/cahapter33.htm>
- NANTULYA, VM; DOYLE, J.J. 1977. Stabilization and preservation of the antigenic specificity of *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* variant specific surface antigens by mild fixation techniques. *Acta Trop.* 34: 313-320.
- NANTULYA, VM; MUSOKE, AJ; RURANGIRWA, FR; MOLOO, ShK. 1984. Resistance of cattle to tsetse-transmitted challenge with *Trypanosoma brucei* or *Trypanosoma congolense* after spontaneous recovery from syringe-passaged infections. *Infect Immunity.* 43 (2): 735-738.
- NANTULYA, VM. 1992. Simple antigen detection slide agglutination tests for diagnosis of non-tsetse transmitted animal trypanosomiasis. En: *I International Seminar on Non-Tsetse Transmitted Animal Trypanosomes*. (October 14-18. 1992; Annecy, France). 34.
- NANTULYA, VM; LINDQVIST, KJ; STEVENSON, P; MWANGI, EK. 1992. Application of a monoclonal antibody-based antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay (antigen ELISA) for field diagnosis of bovine trypanosomiasis at Nguruman, Kenya. *Ann Trop Med Parasitol.* 86(3):225-30.
- OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). 2004. Tripanosomosis (transmitida por la mosca tse—tsé). En: *Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2 .3.15*: 626-634.
- OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (OIE). 2008. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas. En: *Manual de la OIE sobre animales terrestres, Capítulo 1.1.4.:1-13*
- OMAMO, SW; REID, R; ROWLANDS, J; SWALLOW, B; LEAK, S; MULATU, W; KRISTJANSON, P; d'ETEREN, G. 2000. The impacts of tsetse control on disease



- severity, livestock productivity, human welfare, land-use and environment in Ghibe Valley, Ethiopia. <http://ecart.iao.florence.it/Documents/Tsetse.doc>
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. 1973. *Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia*. Centro Panamericano de Zoonosis, OPS. Nota Técnica No. 18: 33pp.
- ORTÍZ-LOSADA, EA; SILVA-CABRERA, E; IZQUIERDO-MARQUÉZ, M. 2007. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. *Rev. electrón. Vet. REDVET*. VIII (4). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040407.html>.
- OSÓRIO ANA LUIZA ALVES ROSA; MADRUGA CLAUDIO ROBERTO; DESQUESNES MARC; SOARES CLEBER OLIVEIRA; RIBEIRO LAURA RAQUEL RIOS; COSTA SYLVIO CELSO GONÇALVES DA COSTA. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 103 (1): 1-13. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762008000100001&lng=en&nrm=iso.
- OTTE, MJ. 1991. La importancia de la trypanosomosis en la industria ganadera de Córdoba, Colombia. *Proyecto ICA/GTZ*. Bogotá, Colombia.: 151 p.
- OTTE, MJ. 1992. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. En *I International Seminar on Non-Tsetse Transmitted Animal Trypanosomoses*. (14-16 Oct., 1992; Annecy, France).: 26.
- OTTE, MJ; ABUABARA, J; WELLS, E. 1994. *Trypanosoma vivax* in Colombia. Epidemiology and production losses. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 26:146-156.
- OUMA, JO; MWANGI, JM; MDACHI, RE; MURILLA, GA. 2007. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) systems for the serodiagnosis of bovine trypanosomosis in disease endemic areas of Kenya. *Science World J.* 2(1): 11-13.



- PARIS, J; MURRAY, M; MOODIMBA, Mc. 1982. A comparative evaluation of parasitological techniques currently available for the diagnosis of african trypanosomiasis. *Acta Trop.* 38: 307-316.
- PEREIRA, L. 1989. Tipificación de patrones tecnológicos en fincas incorporadas a la producción de leche a partir de agosto de 1984 en el Municipio Valle de la Pascua, Distrito Infante, estado Guárico. *Tesis de Pregrado*. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.
- PILLAY, D; IZOTTE, J; FIKRU, R; BÜSCHER, B; MUCACHE, H; NEVES, L; BOULANGÉ, A; TALLA SECK, M; BOUYER, J.; NAPIER, G; CHEVTZOFF, C; COUSTOU, V; BALTZ, T. 2013. *Trypanosoma vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle. Mauricio Martins Rodriguez, Editor Published online 2013 Oct 25. doi: 10.1371/journal.pone.0078565. PMID: PMC3808341. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3808341/>
- QUISPE, A; CHÁVEZ, V; CASAS, A; TRIGUEROS, V; SUÁREZ, A. 2003. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de cuatro distritos de la Provincia de Coronel Portillo, Ucayali. *Rev. Investig.* 14(2):161-165.
- RAE, PF, LUCKINS, AG. 1984. Detection of circulating *Trypanosomal* antigens by enzyme immunoassay. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 78 (6):. 587-596.
- RAMÍREZ, R. 2013. Análisis proteómico diferencial entre dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. *Trabajo de Ascenso*. Universidad del Zulia Facultad de Ciencias Veterinarias. http://tesis.luz.edu.ve/tb_acen_inv/tde_busca/archivo.php?codArchivo=1148
- RAMÍREZ-BARRIOS, RA. 2015. Evaluación clínica, patológica y proteómica de dos aislados venezolanos de *Trypanosoma vivax*. Tesis Doctoral. © Editado por Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2016. Campus de Rabanales. Córdoba, España. www.uco.es/publicaciones:263pp.
- RAMÍREZ-BARRIOS; RA; VALERA, Z; PARRA, O; CHACIN, E; TAVARES-MARQUEZ, L; HOLZMÜLLER, P; MARTÍNEZ-MORENO, A; REYNA-BELL,



- A. 2015. Immunoreactive proteins of *Trypanosoma vivax*. *Rev.Cient.* 25 (4):311-316.
- REBESKI, D E; WINGER, EM; VAN ROOIJ, EM; SCHOCHL, R; SCHULLER, W; DWINGER, RH, CROWTHER, JR; WRIGHT, P. 1999. Pitfalls in the application of enzyme-linked immunoassays for the detection of circulating trypanosomal antigens in serum samples. *Parasitol. Res.* 85: 550-556.
- REBESKI, DE; WINGER, EM; ROBINSON, MM; GLABER, CMG; DWINGER, RH; CROWTHER, JR. 2000. Evaluation of antigen-coating procedures of enzyme-linked immunosorbent assays method for detection of trypanosomal antibodies. *Vet. Parasitol.* 90: 1-13.
- RED DE IDENTIFICACIÓN Y DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HEMOPARÁSITOS CON IMPACTO ECONÓMICO EN EL SECTOR AGROPECUARIO. BID-FONACIT II. 2005. Instituciones participantes: UNESR, IVIC, USB, UNEFM, UCLA, LUZ. Responsable: Trina Perrone. 2005 – 2008. (<http://www.inmunobiologia.net.ve/oproyectos.html>).
- REIFENBERG, JM; 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 *Proceedings of the first internet conference on Salivarian trypanosomes* (FAO animal production and health paper 136). Tryplink-L discussion list 9-14 December 1996. Roberto Aguilar M.S. Silva Alberto M.R. Dávila (Eds.). <http://www.fao.org/docrep/W5781E/W5781E00.htm>
- REY, C. 2004. Hemoparasitosis en América Latina: El Caso Venezuela. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe. *RedEctopar.* 5 p.
- RODRÍGUEZ, I. 1991. Identificación y caracterización de sistemas de producción de medianos productores con bovinos de doble propósito en el Municipio Chaguaramas del estado Guárico. *Tesis de Maestría.* Facultades de Agronomía y Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela.



- RODRÍGUEZ-VIVAS, R; QUIÑONES-ÁVILA, F; RAMÍREZ-CRUZ, G, RUIZ-PIÑA, H. 2003. Presencia del género *Trypanosoma* en la garrapata *Boophilus microplus* en el trópico mexicano. *Rev Biomed*, 14:29-33.
- ROWLANDS, GJ; MULATU, W; AUTHIÉ, E; d'IETEREN, GDM; LEAK, SGA; NAGDA, SM; PEREGRINE, AS. 1993. Epidemiology of bovine trypanosomosis in the Ghibe valley, southwest Ethiopia. 2. Factors associated with variations in trypanosome prevalence, incidence of new infections and prevalence of recurrent infections. *Acta Trop*. 53: 135-150.
- RURANGIRWA, FR; MINJA, SH; MUSOKE, AJ; NANTULYA, VM; GROOTENHUIS, J; MOLOO, SK. 1986. Production and evaluation of specific antisera against sera of various vertebrate species for identification of bloodmeals of *Glossina morsitans centralis*. *Acta Trop*. 43: 379-389.
- SANDOVAL, E; ESPINOZA, E; VALLE, A. 1995. Parasitemia y comportamiento clínico en ovejas infectadas experimentalmente con *Trypanosoma vivax*. *Vet Trop*. 20:67-84.
- SANDOVAL, E; ESPINOZA, E; GONZÁLEZ, N; MORALES, G; MONTILLA, W; JIMÉNEZ, D. 1998. Encuesta ser hematológica en bovinos tripanosusceptibles de dos unidades agroecológicas del Valle de Aroa. *Rev. Cient*. 18(3): 253-258.
- SAN JUAN-LIONS, CF. 2010. Enfermedades causadas por hemoparásitos en ganado bovino. Revisión de Artículo. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Córdoba. Berástegui. España. 43 pp. <http://es.scribd.com/doc/35486431/59/Razas-susceptibles>
- SCHROEDER, WF; LEÓN, CE; LÓPEZ, R. 1971. *Estudio de la anaplasmosis en Venezuela por medio de la prueba de aglutinación en tubo capilar*. Bol. Instituto Investigaciones Veterinarias. FONAIAP. 14: 3-14.
- SEIDL, A; DÁVILA, AMR; SILVA, RAMS. 1999. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian lowlands. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 94(2): 269-272.



- SINSHAW, A; ABEBE, G; DESQUESNES, M; YONI, W. 2006. Biting flies and *Trypanosoma vivax* infection in three highland districts bordering lake Tina, Ethiopia. *Vet. Parasitol.* 142: 35-46.
- SITVEN – PALMAVEN. 1995. *Perfil del proyecto para el desarrollo agroforestal del sur de Aragua*. Dirección de desarrollo económico, científico y tecnológico. Gobierno de Aragua. Fundacite Aragua.: 6 p.
- SIVAJOTHI, S; RAYULU, VC; MALAKONDAIAH, P; SREENIVASULU, D; SUDHAKARA-REDDY, B. 2014. Detection of antibodies against *Trypanosoma Evans* in sheep by indirect ELISA in Rayalaseema region of Andhra Pradesh. *J. Advanced Vet Res.* 4 (3):88-92.
<http://www.advetresearch.com/index.php/avr/article/viewFile/259/187>
- STEEL, RG; TORRIE, JH. 1980. *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Book Com. New York, USA.
- STEIN, J. 2011. Trypanotolerance and phenotypic characteristics of four Ethiopian cattle breeds. *Doctoral Thesis*. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sweden. 63pp.
- STEINDL, F; ARMBRUSTER, C; PIERER, K; PURTSCHER, M; KATINGER, HWD. 1998. A simple and robust method for the complete dissociation of HIV-1 p24 and other antigens from immune complexes in serum and plasma samples. *J Immunol Methods* 217: 143-151.
- STEVENS, JR; GIBSON, WC. 1999. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol Today*, 15:432-437.
- STEVENS, JR; RAMBAUT, A. 2001. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol.* 1: 143–150. DOI:10.1016/S1567-1348(01)00018-1.
- STEVENS, JR; NOYES, HA; SCHOFIELD, CJ; GIBSON, WC. 2001. The molecular evolution of Trypanosomatidae. *Adv Parasitol.* 48:1–56.
- SUÁREZ, C; GARCÍA, F; MELÉNDEZ, R. 2004. Prevalencia de tripanosomiasis bovina en la región ganadera de Tucacas, estado Falcón, Venezuela. En *Memorias del I Simposio Internacional Hemotrópicos y sus vectores*, Caracas, Octubre 2004. pp. 65.



- SUÁREZ, C; GARCÍA, F; ROMÁN, D; CORONADO, A.; PERRONE, T; REYNA, A; PARRA, N. 2009. Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zoot. Trop.* 27(4):363-372.http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692009000400002&script=sci_arttext
- SULBARAN, L; DRESCHER, K; MARTÍNEZ, N; COLMENARES, O; RICCA, R. 2008. Diagnóstico técnico del sistema de producción con vacunos de doble propósito en la zona de colinas del estado Guárico, Venezuela. *Zoot. Trop.* 26(2): 79 – 85.
- TAMASAUKAS, R. 1992a. Epidemiological diagnosis of bovine trypanosomosis in farms of Guarico State, Venezuela. En *I International Seminar on Non-Tsetse Transmitted Animal Trypanosomoses*. (October 14-16, 1992; Annecy, France):. 194.
- TAMASAUKAS, R. 1992b. Seroprevalencia de la trypanosomosis bovina en fincas del estado Guárico, Venezuela. *Trabajo de Ascenso*. Universidad Rómulo Gallegos. San Juan de los Morros, Guárico, Venezuela.: 167 pp
- 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 pp.
- 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 pp.
- TAMASAUKAS, R. 1995. Estudio general de la trypanosomiasis bovina. *Trabajo de Ascenso*. Universidad Nacional Experimental de los Llanos Centrales Rómulo Gallegos. San Juan de los Morros, Guárico, Venezuela. 220pp.
- TAMASAUKAS, R. 2008. Tetralogía hemoparasitaria en ganadería doble propósito venezolana. En: Capítulo XXVII. Libro: Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito. 2008. Carlos González-Stagnaro, Ninoska Madrid Bury y Eleazar Soto Belloso. (Eds): 314-325.
http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_27.pdf



- TAMASAUKAS, R; ROA, N. 1991-1992. Epidemiología básica agroecológica de la trypanosomiasis bovina por *T. vivax* en el estado Guárico, Venezuela. *Rev Fac Cs Vet Univ Central Vzla.* 38 (1-8):. 143-165.
- TAMASAUKAS, R; GONZÁLEZ, A. 1994. Seroprevalencia de la trypanosomosis (*Trypanosoma vivax*) en fincas del Municipio Ortíz, estado Guárico, Venezuela. (Resultados preliminares). En *VIII Congreso Venezolano de Zootecnia.* (16-19 Noviembre, 1994; San Juan de los Morros, Guárico, Venezuela):. S011.
- TAMASAUKAS, R; FLORIO-LUIS DE PINEDA, J. 2014. Avances y perspectivas sobre diagnóstico y control estratégico de la tripanosomosis en Ganadería Doble Propósito. En *Logros y Desafíos de la Ganadería Doble Propósito.* Sección 4, Sanidad, Capítulo XLI páginas. C. González-Stagnaro, N Madrid-Bury y E. Soto Belloso (Eds.). Colección Fundación GIRARZ. ISBN 978-980-6863-16-3. Depósito legal 1f 06120146362669. Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela.:396-406.
- 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, PM. 2000. Agriecoepidemiology of Trypanosomosis due *Trypanosoma vivax* in Ruminants of Some Farms Located in Venezuela: Technical Note. *Rev Cient.* 10(6):453-457.
- TAMASAUKAS, R; ROA, N; AGUIRRE, A; RON, J; COBO, M. 2000a. Tetralogía Hemoparasitaria en Algunas Fincas Bovinas del Municipio Santa Rita, Estado Guárico, Venezuela. *Rev Fac Cs Vet Univ Central Vzla.* 8(4):101-108.
- TAMASAUKAS, R; PURROY, R; RODRÍGUEZ, H; RUIZ, H; ROA, N; LABRADOR, C. 2002. Seroprevalencia de tripanosomiasis y brucelosis bovina en fincas integradas a la producción de maíz, de la zona alta de los municipios Roscio y Ortíz, estado Guárico, Venezuela. *Rev. Cien.* 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. *Rev Cient*, 16(6): 575 – 578.
- TAMASAUKAS, R; AGUDO-CASTELLANOS, L; SILVA-RAVELO, A; FLORIO-LUIS, J; VINTIMILLA-TAMASAUKAS, M; RIVERA-PIRELA, S. 2010. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Agron Mesoamericana*. 21(2):367-381.
- TAMASAUKAS, R. 2011. Evaluación de productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para su aplicación en el diagnóstico por ELISA de la trypanosomosis bovina. *Proyecto Tesis Doctoral*. Doctorado en Ciencias, Postgrado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Venezuela. 78pp.
- TAMASAUKAS, R. 2011a. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito de Venezuela. *Trabajo presentado en Seminario I*. Doctorado en Ciencia, Postgrado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Aragua, Venezuela. 32pp.
- TAMASAUKAS, R; FLORIO-LUIS, J. 2011. La tripanotolerancia: condición estratégica biotecnológica para la sustentabilidad de la producción ganadera doble propósito. En: Libro *"Innovación y Tecnologías en la Ganadería Doble Propósito"*. Carlos González Stagnaro, Ninoska Madrid Bury & Eleazar Soto Belloso (Eds.). Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela. ISBN 978-980-6863-05. : 423-427.
- TAMASAUKAS, R, FLORIO, J, COBO, M, RIVERA, S. 2012. Evaluación de un extracto antigénico especie-específico de *Trypanosoma vivax* en el diagnóstico por ELISA de la trypanosomosis bovina. I Parte. Valores hematológicos, de prevalencia y de seroprevalencia. En *Jornadas de Investigación. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela*. Maracay. Venezuela. 28 – 20 de Junio de 2012.
- TAMASAUKAS, R; AGUDO, L; FLORIO, J; LEON, D; MONTOYA, M; RIVERA, S; COBO, M; TAMASAUSKAS, C. 2013a. Diagnóstico participativo sanitario en temática de hemotrópicos en la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, República Bolivariana de Venezuela. 2013. En Resúmenes del



- I Encuentro Regional de Ciencia, Tecnología e Innovación Región Centro-Norte, Carabobo 2013. Naguanagua, 13 al 16 de Junio de 2013. Depósito Legal: lfi35920136002505. ISBN: 978-980-7637-00-8.
- TAMASAUKAS, R; AGUDO, L; FLORIO, J; LEÓN, D; MONTOYA, M; TAMASAUSKAS, C; RIVERA, S; COBO, M. 2013b. Caracterización de grupos raciales bovinos en la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, República Bolivariana de Venezuela a través de marcadores fenotípicos para identificar tripanotolerancia. En: *Memorias del IV Congreso de Diversidad Biológica. Universidad Bolivariana de Venezuela, Paraguaná, estado Falcón*; 23 al 28 de Junio de 2013. Pp.
- TAMASAUKAS R; SILVA A; FLORIO-LUIS, J; SÁNCHEZ, J; FERNÁNDEZ, M; RIVERA, S; COBO, M. 2014a. Agroecoepidemiología de tripanosomosis en ganadería doble propósito en el Sistema de Riego Río Guárico, Venezuela. Etapa I. *AICA* .4: 285-288.
- TAMASAUKAS, R, SILVA-RAVELO, A, FLORIO-LUIS, J, SÁNCHEZ, J, RON, J.J, FERNÁNDEZ, M, COBO, M, RIVERA, S. 2014b. *Modelo de experimentación estratégica para el estudio agroecoepidemiológico y productivo de la tripanosomosis por Trypanosoma vivax en un sistema de producción bovina doble propósito, ubicado en el Municipio Francisco de Miranda, estado Guárico, Venezuela*. ISBN-13: 978-3-8484-5486-0. ISBN-10: 3848454866. EAN: 9783848454860. Editorial Académica Española. Copyright © OmniScriptum GmbH & Co. KG. Abril, 2014. <https://www.eae-publishing.com/catalog/details/store/de/book/978-3-8484-5486-0/experimentaci%C3%B3n-estrat%C3%A9gica-del-trypanosoma-vivax-en-ganader%C3%ADa-bovina?search=adolescencia%202014>
- TAVARES, LM. 2013. Estudio de las proteínas inmunogénicas de *Trypanosoma vivax*. Universidad Simón Bolívar, Venezuela. *Tesis de Grado*. 204 pp.
- TAYLOR, K A. 1998. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic?. *Int. J. Parasitol.* 28(2): 219-240.



- TIJSSSEN, P. 1993. - *Practice and theory of enzymeimmunoassays. Series Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. No. 15. Elsevier Science. Amsterdam. 576 pp.
- TORO, M; LEÓN, E; LÓPEZ, R; RUÍZ, R; GARCÍA, JA. 1979. La técnica de la microcentrifugación en el diagnóstico de la trypanosomosis bovina. *Acta Científica. Vzlna*. 30(5):502-506.
- TORO M, LEÓN, E; LÓPEZ, R; GARCÍA, J; RUIZ, A. 1980. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Vet Trop*. 5(1): 43-50.
- TORO, M; LEÓN, E; PALLOTA, F; LÓPEZ, G; GARCÍA, JA; RUÍZ, A. 1983. Prevalencia de hemoparasitosis en bovinos del Estado Guárico. *Vet. Trop*. 8: 21-36.
- TORO, M; LÓPEZ, R; LEÓN, E; RUIZ, A, GARCÍA, J. 1980. Resultados de un muestreo serológico sobre bovinos portadores de *Babesia*, mediante inmunofluorescencia indirecta. *Vet Trop*. 5(1):3-8.
- TORO, M. 1990. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. En *Hemotrópicos: biología y diagnóstico*. Colección Cuadernos USB. Serie Biología, Nº 1. Universidad Simón Bolívar, Caracas.
- THUMBI, SM; McODIMBA, FA; MOSI, RO; JUNG´A. 2008. Comparative evaluation of three PCR base diagnostic assays for the detection of pathogenic trypanosomes in cattle blood. *Parasit Vectors*. 1:46. doi: 10.1186/1756-3305-1-46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2615751/>
- USALBIOMEDICA. 2014. *Epidat (Versión 4.1): Análisis Epidemiológico de Datos*. En: <https://usalbiomedica.wordpress.com/2014/10/30/epidat-version-4-1-analisis-epidemiologico-de-datos/>
- UZCANGA, G; MENDOZA, M; ASO, P; BUBIS, J. 2002. Purification of a 64Kda antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitol*. 124:287-299.
- VACCARO, L. 1989. Sistemas de producción bovina predominantes en el trópico latinoamericano. En *Panorama de la Ganadería de Doble Propósito en la América Tropical*. Arango Nieto L., A. Charry y R. Vera (Eds.). ICA - CIAT. Bogotá, Colombia. pp. 29 - 43.



- VALERA, Z; PARRA, O; ALVARADO, M; BARBOZA, G; ESCALONA, F; RAMÍREZ, R. 2005. Efecto de la infección experimental con *Trypanosoma vivax* sobre parámetros hematológicos en ovinos. *Rev Cientif.* 15(5): 412-420.
- VAN DEN BOSSCHE, P. 2001. Some general aspects of the distribution and epidemiology of bovine trypanosomosis in southern Africa. *Intern. J. Parasitol.* 31(5-6):591-597.
- VAN DER WAAIJ, E, HANOTTE, O; VAN ARENDONK, J; KEMP, S; KENNEDY, D; GIBSON, J; TEALE, A. 2003. Population parameters for traits defining trypanotolerance in an F2 cross of N'Dama and Boran Cattle. *Livestock Prod Sci.* 84 (3): 219 – 230.
- VAN MEIRVENNE, N; MAGNUS, E; VERVOORT, T. 1977. Comparisons of variable antigenic types produced by trypanosome strains of the subgenus Trypanozoon. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.* 57 (4-5): 409-423.
- VENTURA, RM; PAIVA, F; SILVA RA; TAKEDA GF; BUCK GA; TEIXEIRA MM. 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.
- WOO, PTK. 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of african trypanosomosis. *Acta Trop.* 27: 384-386.
- WRIGHT, PF; NILSSON, E; VAN ROOIJ, EM; LELENTA, M, JEGGO, MH. 1993. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech.* 12(2):435-50.
- WRIGHT, PF; TOUNKARA, K; LELENTA, M; JEGGO, MH. 1997. International reference standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 16 (3), 824-832.



ANEXOS



**Anexo 1. Productividad Doctorado en Ciencias Veterinarias FCV-UCV
Período 2010 – 2016 (Componente: Hemotrópicos- Tripanosomosis) Rita Tamasaukas**



A. PREMIOS Y ACREDITACIONES EN SISTEMA NACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN:

1. PREMIO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA 2010, Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de la República Bolivariana de Venezuela. 2010.
2. CATEGORÍA INVESTIGADORA NIVEL C, 2011, 2013, 2015. Programa de Estímulo a la Investigación e Innovación (PEII), Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias de la República Bolivariana de Venezuela. Registro Nacional: RNII N° V-04228028-0102-2013.

B. PUBLICACIONES:

1. Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Alba Silva, Josefina Sánchez, Magdalena Sánchez, Jesús Ron, Jazmín Florio, Sergio Rivera. "Hemoparasitosis en Ganadería Doble Propósito Venezolana, Diagnóstico y Control: Una Revisión". Revista Agronomía Mesoamericana. 21 (2): 383-386. ISSN 1021-7444. 2010.
2. Rita Tamasaukas. "Trypanotolerant and trypanosusceptible type dual purpose cattle in the lowlands of Venezuela: phenotypic identification and characterization". Advances in Animal Biosciences. 1: 392-392. <http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=7921991>. 2011.



3. Rita Tamasaukas, Jazmín Florio. “ La Trypanotolerancia, Condicion Estratégica en Biotecnología para la Sustentabilidad de la Producción Ganadera Doble Propósito. En: Libro "Innovación y Tecnologías en la Ganadería Doble Propósito. Carlos González Stagnaro, Ninoska Madrid Bury & Eleazar Soto Beloso (Eds.). Ediciones Astro Data S.A. Maracaibo, Venezuela. ISBN 978-980-6863-05. 2011.
4. Florio - Luis, Jazmín; Tamasaukas, Rita y Agudo, Leonel. “La Trypanotolerancia en Ganadería Bovina en la República Bolivariana de Venezuela: Énfasis en Bovinos Criollos”. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. RED CONBIAND. ISSN: 2253-7325. Depósito Legal: (CO 1364-2011). No. 1.: 304-308. 2011.
5. Jazmín-Florio, Tamasaukas, Rita y Agudo, Leonel. “La Trypanotolerancia en Ganadería Bovina en la República Bolivariana de Venezuela: Énfasis Bovinos Criollos. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. Vol 1: http://www.uco.es/conbiand/aica/templatemo_110_lin_photo/PDF/Florio2011_1_304_308.pdf. ISSN (ON LINE) 2253-9727. 2011.
6. Jazmín Florio y Rita Tamasaukas. “Bovinos Trypanotolerantes: Condición genética de importancia en la preservación de razas y el mejoramiento genético animal”. Revista Producción y Negocio N° 47. pp: 54 – 56. 2011.
7. Marcos Pineda, Jazmín Florio y Rita Tamasaukas. “Geopolítica de la Biodiversidad. I Parte: Conservación Ambiental”. Revista Produccion y Negocios. N° 48: 22-24. Enero-Febrero 2012.
8. Florio-Luis J., Tamasaukas R., Rivera S. “Diagnóstico Participativo de Hemotrópicos en Bovinos a Nivel de Pequeños Productores y Productoras de Ganadería Doble Propósito en el Sur del Estado Aragua en la República Bolivariana de Venezuela”. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. Vol 2:163-170. <http://www.aicarevista.es/>. ISSN (ON LINE) 2253-9727. 2012.
9. Jazmín Florio y Rita Tamasaukas. “Hemoparasitos en la ganadería bovina”. Revista Producción y Negocio N° 57. pp: 38 – 40. 2013
10. Jazmín Florio y Rita Tamasaukas. “El uso de la tecnología para el diagnóstico de hemoparásitos: Caso QBC Idexx®”. Revista Producción y Negocio N° 56. pp: 46 - 48. 2013.
11. Rita Tamasaukas. Manual de Toma, Almacenamiento y Transporte de Muestras para Diagnóstico Veterinario. Productos de Proyectos de Investigación, Acción; Participativa; Transformadora, (IAPT). Boletín del Laboratorio de Biotecnología de Investigación y Prestación de Servicios En Salud Animal Integral (LABIPRESAN)-UNERG. 3:1-36. 2013. Depósito Legal: pp201003gu648. 2013.



12. Jazmín Florio, Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Duglas León, José Fajardo e Iliana Bonyorni. 2014. "Evaluación Clínica de Bovinos como Complemento al Diagnóstico de Hemoparásitos". Revista Producción y Negocio. Revista Producción y Negocio N° 60. 2014.

13. Rita Tamasaukas, Jazmín Florio. 2014. "Avances y Perspectivas sobre Diagnóstico y Control Estratégico de la Tripanosomosis en Ganadería Doble Propósito", en el Capítulo XLI de Sanidad Animal. Libro Logros, desafíos y estrategias de desarrollo en Ganadería Doble Propósito. VI° Curso Internacional de Ganadería Doble Propósito. Mayo 2014, Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Fundación GIRARZ.

14. Tamasaukas R., Silva A., Florio-Luis J., Sánchez J. ; Fernández M. , Rivera S., Cobo M. Agroecoe epidemiología de Tripanosomosis en Ganadería Doble Propósito en el Sistema de Riego Río Guárico, Venezuela. Etapa I (Trypanosomosis Agroecoe epidemiology in Dual Purpose Cattle at Guarico River Irrigation System, Venezuela. Phase I). AICA - Actas Iberoamericanas de Conservación Animal Red CONBIAND. www.aicarevista.es. 2014.

15. Rita Tamasaukas, Alba Silva, Jazmín Florio-Luis, Josefina Sánchez, Magdalena Fernández, Jesús Ron, Leonel Agudo, Duglas León, Margarita Cobo, Sergio Rivera. 2014. Modelo de Experimentación Estratégica para el Estudio Agroecoe epidemiológico y Productivo de la Trypanosomosis por *Trypanosoma vivax* en Un Sistema de Producción Bovina Doble Propósito, ubicado en el Municipio Francisco de Miranda, Estado Guárico, Venezuela". 2014. Libro publicado por la Editorial Académica Española. España. 2014.

16. Jazmín Florio Luis; Sunshine Florio Luis; Marcos Pineda; Cristina Tamasauskas; Rita Tamasaukas. Prácticas agroecológicas utilizadas en la ganadería bovina: aspectos generales. Carabobo Pecuario. No. 184: 39-40. 2014.

17. Rita Tamasaukas. Informe seguimiento epidemiológico Centro Nacional de Reproducción e Inseminación Artificial (CENARIA), Empresa Socialista Ganadera Santos Luzardo, C.A. (ESGDSLCA). Informes y Testimonios de Investigación Participativa. En: Boletín del Laboratorio de Biotecnología, Investigación y Prestación de Servicios en Sanidad Animal (LABIPRESAN)- UNERG. Vol. 6:1-12. 2014. Depósito Legal: pp201003gu648. 2014.

18. Rita Tamasaukas. Aprendizaje e Investigación Participativa para el Desarrollo e Implementación de Innovaciones Tecnológicas Aplicadas a la Agricultura, Ganadería, Recursos Genéticos y Biotecnología Agrícola, en el Marco de la I Gira Técnica de Aprendizaje e Investigación Participativa para el Desarrollo e Implementación de Innovaciones Tecnológicas Aplicadas a la Agricultura, Ganadería, Recursos Genéticos y Biotecnología Agrícola. Informes y Testimonios de Investigación Participativa. En: Boletín del Laboratorio de Biotecnología, Investigación y Prestación de Servicios en



Sanidad Animal (LABIPRESAN)- UNERG. Vol. 7. 5-10. 2015. Depósito Legal: pp201003gu648. 2015.

19. Tamasaukas Rita, Jazmin E. Florio L., Leonel J. Agudo C., Duglas E. Leon N., Maureen V. Monyoya M., Sergio E. Rivera P. “Tetralogía Hemotrópica como Marcador Fenotípico a Tripanotolerancia, en Ganadería Bovina Doble Propósito en Predios del Sur de Aragua, Venezuela”. Revista Observador del Conocimiento (OC). Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación. Revista Observador del Conocimiento (OC). Vol 3. No. 5. 2016.

C. PUBLICACIONES RESÚMENES EN MEMORIAS ARBITRADAS:

1. Jazmín Florio, Rita Tamasaukas. Trypanotolerancia, Calidad que Favorece la Preservación de la Biodiversidad y Germoplasma Animal: Caso Bovinos Criollos. Libro de Resúmenes del II Congreso Venezolano sobre Diversidad Biológica. Línea Estratégica: Gestión de la Información sobre Biodiversidad Biológica. Caracas, 22 al 25 de Mayo de 2011. Pág. 16.
2. Leonel Agudo, Rita Tamasaukas, Jazmín Florio. Identificación y Caracterización de Tipo Bovino Trypanotolerante en los Llanos Centrales de Venezuela: Recurso Biotecnológico Alternativo para la Producción Ganadera Sustentable. Libro de Resúmenes del II Congreso Venezolano sobre Diversidad Biológica. Línea Estratégica: Aprovechamiento sustentable de la biodiversidad biológica. Caracas, 22 al 25 de Mayo de 2011. Pág. 107.
3. Jazmín Florio, Rita Tamasaukas, Leonel Agudo. La Trypanotolerancia en Ganadería Bovina en la República Bolivariana de Venezuela: Énfasis en Bovinos Criollos. En: Sección: Biotecnología Aplicada a la Conservación. Resúmenes XII Simposio Iberoamericano sobre la Conservación y Utilización de los Recursos Zoogenéticos. Panamá. 23 al 25 de Noviembre de 2011.
4. Jazmín Florio, Gloria Contreras, Sunny Zambrano, Abdenago Fuenmayor, José Fajardo, Rita Tamasaukas. Estrategias para la Preservación y Mejoramiento Genético de la Raza Bovina Criollo Limonero de Venezuela. Simposio Biotecnología Moderna para la Sanidad Animal. Resúmenes del Congreso Biotecnología Habana 2011. 28/11 al 03/12/2011.
5. Jazmín Florio, Rita Tamasaukas, Leonel Agudo. La Trypanotolerancia en Ganadería Bovina en La República Bolivariana de Venezuela: Énfasis en Bovinos Criollos. Simposio Biotecnología Moderna para la Sanidad Animal. Resúmenes del Congreso Biotecnología Habana 2011. 28/11 al 03/12/2011.
6. Jazmín Florio, Rita Tamasaukas. Trypanotolerancia, Calidad que Favorece la Preservación de la Biodiversidad y Germoplasma Animal: Caso Bovinos Criollos. Simposio Biotecnología Moderna para la Sanidad Animal. Resúmenes del Congreso Biotecnología Habana 2011. 28/11 al 03/12/2011.
7. Rita Tamasaukas. Aplicaciones Biotecnológicas en Sanidad Animal para la Sustentabilidad de la Producción Ganadera Doble Propósito en el Trópico: Con Énfasis en Trypanosomosis y Trypanotolerancia. Simposio Biotecnología Moderna para la



Sanidad Animal. Resúmenes del Congreso Biotecnología Habana 2011. 28/11 al 03/12/2011.

8. Leonel Agudo, Rita Tamasaukas, Jazmín Florio. Caracterización Fenotípica de Bovinos Trypanotolerantes en Fincas Doble Propósito en los Llanos Centrales de Venezuela: Recurso Biotecnológico Alternativo para la Producción Ganadera Sustentable. Simposio Biotecnología Moderna para la Sanidad Animal. Resúmenes del Congreso Biotecnología Habana 2011. 28/11 al 03/12/2011.

D. MANUAL:

1. Rita Tamasaukas, Ramón Navas, Josefina Sánchez, Manual de toma, almacenamiento y transporte de muestras para diagnóstico veterinario. 1ra Edición 2009. 2da Edición Febrero 2013.

E. CONFERENCIAS, PONENCIAS, TRABAJOS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS NACIONALES E INTERNACIONALES, RESUMENES EN MEMORIAS ARBITRADAS (CERTIFICADAS)

1. *Congrès International "Productions Animales Durables en régions Tropicales" SAPT 2010. 14 al 18 de Noviembre de 2010. Gosier, Guadalupe (French West Islands).*
 - Leonel Agudo, Rita Tamasaukas, Alba Silva, Josefina Sánchez, Jesús Ron, Magdalena Fernández, Jazmín Florio, Maria Vintimilla, Omar Colmenares, Sergio Rivera. "Trypanotolerant and Trypanosusceptible Type Dual Purpose Cattle in the Lowlands of Venezuela: Phenotypic Identification and Characterization".
2. *XII Jornadas de Actualización en Medicina y Producción de Rumiantes. 08 y 09 de julio de 2011. FCV-UCV. Maracay, estado Aragua*
 - Rita Tamasaukas. PONENCIA: Brucelosis y Tuberculosis Animal: Desafíos a Nivel Mundial.
3. *II Congreso Venezolano sobre Diversidad Biológica. Caracas, 22 al 25 de Mayo de 2011.*
 - Jazmin Elvira Florio Luis y Rita Tamasaukas. Trypanotolerancia, cualidad que favorece la preservación de la biodiversidad y germoplasma animal: Caso bovinos criollos.
 - Leonel José Agudo Castellanos; Rita Tamasaukas y Jazmin Florio. Identificación y caracterización de tipo bovino trypanotolerante en los Llanos Centrales de Venezuela: recurso biotecnológico alternativo para la producción ganadera sustentable.
4. *XII Simposio sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos. Red CONBIAND. 23 al 25 de Noviembre de 2011.*
 - Jazmín Florio, Rita Tamasaukas y Leonel Agudo. La Trypanotolerancia en Ganadería Bovina en la República Bolivariana de Venezuela: Énfasis Bovinos Criollos.
5. *Congreso Biotecnología Habana 2011. La Habana, Cuba. 28 de Noviembre al 03 de Diciembre de 2011.*



- Rita Tamasaukas. CONFERENCIA: Aplicaciones Biotecnológicas para la Sustentabilidad de la Producción Ganadera Doble Propósito en el Trópico: Con énfasis en Trypanosomosis y Trypanotolerancia.
 - Jazmín Florio y Rita Tamasaukas. Trypanotolerancia, Calidad que Favorece la Preservación de la Biodiversidad y Germoplasma Animal: Caso Bovinos Criollos.
 - Jazmín Florio, Gloria Contreras, Sunny Zambrano, Abdenago Fuenmayor, José Fajardo, Rita Tamasaukas. Estrategias para la Preservación y Mejoramiento Genético de la Raza Bovina Criollo Limonero de Venezuela.
 - Jazmín Florio, Rita Tamasaukas y Leonel Agudo. La Trypanotolerancia en Ganadería Bovina en la República Bolivariana de Venezuela: Énfasis Bovinos Criollos.
 - Leonel Agudo, Rita Tamasaukas y Jazmín Florio. Caracterización Fenotípica de Bovinos Trypanotolerantes en Fincas Doble Propósito en los Llanos Centrales de Venezuela: Recurso Biotecnológico Alternativo para la Producción Ganadera Sustentable.
6. *Postgrado en Medicina Veterinaria. Doctorado en Ciencias. FCV-UCV. Maracay, estado Aragua. Abril 2012.*
 - Rita Tamasaukas. Hemoparasitosis en Ganadería Doble Propósito de Venezuela.
 7. *III Congreso Venezolano de Diversidad Biológica. San Carlos, estado Cojedes, República Bolivariana de Venezuela. 22 al 26 de Mayo de 2012.*
 - Florio, J., Tamasaukas, R. y Agudo, L. Bovinos Trypanotolerantes en la República Bolivariana de Venezuela.
 8. *I Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación. Caracas, Venezuela. 23 al 26 de Septiembre de 2012.*
 - Silva, Alba; Tamasaukas, Rita; Sánchez, Josefina; Ron, José de Jesús; Agudo, Leonel; Florio-Luis, Jazmín y Colmenares, Omar. Situación Epidemiológica de *Trypanosoma vivax* en Rebaños Bovinos Doble Propósito en el Estado Guárico, República Bolivariana de Venezuela.
 - Florio-Luis, Jazmín, Tamasaukas, Rita y Rivera, Sergio. Caracterización de Pequeños Productores y Productoras de Ganadería Doble Propósito en el Sector de Valle de La Cruz, estado Aragua.
 - Florio-Luis, Jazmín, Tamasaukas, Rita y Rivera, Sergio. Condición Corporal y Color de Mucosas como Indicativo de Anemia y Hemótrópicos en Bovinos Doble Propósito en el Sur de Aragua.
 9. *XIII Simposio Iberoamericano Sobre Conservación y Utilización de los Recursos Zoogenéticos. San Lorenzo, Paraguay. 24 al 26 de Octubre de 2012.*
 - Florio - Luis, Jazmín; Tamasaukas, Rita y Rivera, Sergio. Diagnóstico Participativo de Hemótrópicos en Bovinos a Nivel de Pequeños Productores y Productoras de Ganadería Doble Propósito en el Sur del estado Aragua en la República Bolivariana de Venezuela.
 10. *XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Cartagena de Indias, Colombia. 24 al 27 de octubre de 2012.*



- Rita Tamasaukas, Jazmín Florio L., Margarita Cobo, Sergio Rivera P. Evaluación de un extracto antigénico especie-específico de *Trypanosoma vivax* en el diagnóstico por ELISA de la trypanosomosis bovina. I parte: valores hematológicos, de prevalencia y de seroprevalencia.
 - Jazmín Florio-Luis; Rita Tamasaukas y Sergio Rivera. Asociación entre Indicadores Clínicos y Hematológicos con Presencia de Hemótrópicos en Bovinos Doble Propósito en el Sur de Aragua de la República Bolivariana de Venezuela.
 - Alba Silva; Rita Tamasaukas; Josefina Sánchez; José de Jesús Ron; Leonel Agudo; Jazmín Florio- Luis y Omar Colmenares. Situación Epidemiológica de *Trypanosoma vivax* en Rebaños Bovinos Doble Propósito en el Estado Guarico, República Bolivariana de Venezuela.
11. IV Congreso Venezolano de Diversidad Biológica. Península de Paraguaná, estado Falcón. 23 al 28 de Junio de 2013
- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Duglas León, Maureen Montoya, Cristina Tamasauskas, Sergio Rivera, Margarita Cobo. Caracterización de Grupos Raciales Bovinos en la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, República Bolivariana de Venezuela a Través de Marcadores Fenotípicos para Identificar Tripanotolerancia.
 - Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Duglas León, Maureen Montoya, Cristina Tamasauskas, Sergio Rivera, Margarita Cobo. Diagnóstico Participativo en la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, República Bolivariana de Venezuela.
 - Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Duglas León, Maureen Montoya, Cristina Tamasauskas, Sergio Rivera, Margarita Cobo. Acompañamiento Técnico y Aprendizaje Cooperante en Temática de Salud Animal Integral en la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen De Cura, Camatagua, República Bolivariana de Venezuela, para Aprovechamiento Sustentable de los Recursos Zoogenéticos.
 - Duglas León, Rita Laima Tamasauskas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Maureen Montoya, Cristina Tamasauskas, Sergio Rivera, Margarita Cobo. Diagnóstico Participativo de Factores de Riesgo Asociados a la Brucelosis en Rebaños Bovinos Doble Propósito de la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, estado Aragua, República Bolivariana de Venezuela.
 - Jazmín Florio, Rita Tamasaukas, Sergio Rivera. Aprovechamiento de Recursos Fito y Zoogenéticos en la Red Socialista de Innovación Productiva Valle de La Cruz, Municipio San Sebastián de los Reyes del Estado Aragua.
12. Primer Encuentro Regional de Ciencia Tecnología e Innovación de la Región Centro-Norte. FUNDACITE Carabobo. Valencia, Venezuela. 2013.
- Maureen Montoya, Rita Tamasaukas, Duglas León, Jazmín Florio, Sergio Rivera. Aplicación Teórica-Práctica para la Elaboración de Un Probiótico Artesanal en Sistemas de Producción de la Red Socialista de Innovación Productiva de Ganadería Bovina Doble Propósito de Camatagua, estado Aragua.
 - Duglas León, Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Maureen Montoya, Jazmín Florio, Cristina Tamasauskas. Diagnóstico Participativo de Factores de Riesgo Asociados a la Brucelosis en Rebaños Bovinos Doble Propósito de la Red Socialista de



Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, estado Aragua, República Bolivariana De Venezuela.

- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Duglas León, Maureen Montoya, Sergio Rivera, Margarita Cobo, Cristina Tamasauskas. Diagnóstico Participativo Sanitario en Temática de Hemotrópicos en la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, República Bolivariana de Venezuela.

13. 2do. Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación. Caracas, Venezuela. 2013.

- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Duglas León, Maureen Montoya, Sergio Rivera. Tetralogía Hemotrópica como Marcador Fenotípico a Tripanotolerancia, en Ganadería Bovina Doble Propósito en Predios del Sur de Aragua, Venezuela.

14. XXIII Reunión de La Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA, 2013), V Congreso de Producción Animal Tropical, Taller Internacional Sobre Conservación, Mejora y Desarrollo de los Recursos Zoogenéticos. Palacio de Convenciones de La Habana, La Habana, Cuba. 18 al 22 de noviembre del 2013.

- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo; Jazmín Florio-Luis, Duglas León, Maureen Montoya y Sergio Rivera. "Caracterización de bovinos tripanotolerantes en razas Criollas en la República Bolivariana de Venezuela."
- Duglas León, Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Maureen Montoya, Sergio Rivera. "Diagnóstico Participativo de Factores de Riesgo Asociados a la Brucelosis en Rebaños Bovinos Doble Propósito de la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, estado Aragua, República Bolivariana de Venezuela."
- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Duglas León, Maureen Montoya, Sergio Rivera. "Tetralogía Hemotrópica como Marcador Fenotípico a Tripanotolerancia, en Ganadería Bovina Doble Propósito en Predios del Sur de Aragua, Venezuela."
- Rita Tamasaukas, Alba Silva, José de Jesús Ron, Leonel Agudo, Jazmín Florio-Luis, Sergio Rivera. "Evaluación Epidemiológica de *Trypanosoma vivax* en Rebaños Bovinos Doble Propósito en el estado Guárico, República Bolivariana de Venezuela."
- Rita Tamasaukas. "Acompañamiento Técnico y Aprendizaje Cooperante en Temática de Salud Animal Integral en la Red Socialista de Innovación Productiva de Carmen de Cura, Camatagua, República Bolivariana de Venezuela para Aprovechamiento Sustentable de los Recursos Zoogenéticos."

15. X Congreso Venezolano de Ecología. 18 al 23 de Noviembre, 2013. Mérida, Venezuela.

- Florio-Luis, Jazmín Elvira; Tamasaukas, Rita; Agudo, Leonel; Rivera Pirela, Sergio; Fajardo, José Gregorio; Moreno, Norka; Martínez, Victor; Morales, Gustavo; Pino, Luz; Sandoval, Espartaco y Jimenez, Delia. "Resistencia y tolerancia a parásitos gastrointestinales y trypanosomosis en bovinos criollos como condición de manejo sustentable y preservación".

16. 6th ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology (ACTM). 5-7 March 2014. Intercontinental Kuala Lumpur, Malaysia



- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo; Jazmín Florio-Luis, Duglas León, & Sergio Rivera. "Evaluation of Phenotypic Markers to Trypanotolerance in Dual Purpose Cattle in Farms of South Aragua State, Venezuela".
17. *Encuentro Regional de Ciencias Tecnología e Innovación. Región Llanera. 28 de Julio al 02 de Agosto de 2014, San Juan de los Morros, estado Guárico.*
- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo; Jazmín Florio-Luis, Duglas León, Carlos Domínguez, Pablo Pizzani, Guiseppe Schembari, Raymer Ramírez, Susmira Godoy, Cristina Tamasauskas, César Molina, & Orlando Ramírez. Sergio Rivera. "Curso de Ampliación de Conocimientos en Innovaciones y Perspectivas para la Producción Ganadera Agroecológica".
1. Rita Tamasaukas (Coordinadora). "Conversatorio en Ganadería".
1. *VI° Curso Internacional de Ganadería Doble Propósito "Logros, desafíos y estrategias de desarrollo en Ganadería Doble Propósito" , 25 al 27 de Septiembre de 2014, Maracaibo, estado Zulia.*
- Rita Tamasaukas. Conferencia: "Avances y perspectivas sobre diagnóstico y control estratégico de la tripanosomosis en GDP."
2. *XV Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos - CONBIAND - M É X I C O 2 0 1 4 . 8 al 10 de Octubre de 2014. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. México.*
- Tamasaukas, Rita; Silva, Alba; Florio-Luis, Jazmín; Sánchez, Josefina; Fernández, Magdalena; Rivera, Sergio; Cobo, Margarita. "Agroecoepidemiología de Tripanosomosis en Ganadería Doble Propósito en el Sistema de Riego Río Guárico, Venezuela. Etapa I."
 - Tamasaukas, Rita; Silva, Alba; Florio-Luis, Jazmín; Sánchez, Josefina; Fernández, Magdalena; Rivera, Sergio; Cobo, Margarita. "Aplicación de Un Modelo de Experimentación para Determinación de Repercusiones Económico-Productivas de la Trypanosomosis en Venezuela"
20. *XI Jornadas de Investigación del Decanato de Ciencias Veterinarias, UCLA , 5 al 7 de Noviembre de 2014. Baquisimeto, estado Lara.*
- Tamasaukas, Rita; Silva, Alba; Florio-Luis, Jazmín; Sánchez, Josefina; Fernández, Magdalena; Rivera, Sergio; Cobo, Margarita. "Aplicación de Un Modelo de Experimentación para Determinación de Repercusiones Económico-Productivas de la Trypanosomosis en Venezuela. "
21. *XXIV Jornadas "José Witremundo Torrealba", de la Sociedad Parasitológica Venezolana. Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED-UC), 4 de Julio de 2015. Maracay, estado Aragua.*
- Tamasaukas, R., Florio-Luis de Pineda, J., Agudo-Castellanos, L, León, D., Rivera, S. "Evaluación por ELISA de Extractos Antigénicos Especie-Específicos de Cepas Locales de *Trypanosoma vivax* en Sistemas Bovinos Doble Propósito".
22. *XVI Simposio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos - CONBIAND-2015. 07 al 09 de Octubre de 2015. Villavicencio, Colombia.*
- Tamasaukas, R; Florio-Luis de Pineda, J., Agudo; Castellanos, L.; León, D.; Rivera, S. "Diagnóstico por ELISA de la tripanosomosis bovina, avances de la evaluación



en campo de extractos antigénicos especie-específicos de cepas locales de *Trypanosoma vivax* en sistemas ganaderos doble propósito."

23. 3er. Encuentro Regional de Ciencia, Tecnología e Innovación CYTVEN Occidente 2015. 05 al 09 de Octubre de 2.015. Hotel Venetur Maracaibo. Maracaibo, estado Zulia.

- Tamasaukas, Rita. (Coordinadora General). Cursos Pre-Encuentro: Tríada Salud Animal Integral –Alimentación – Reproducción para el Desarrollo Pecuario Sustentable
- Dra. Rita Tamasaukas (UNERG), Dr. Alfredo Sánchez Villalobos (LUZ), Dr. Gilberto Sánchez (AGROBIOTEK); Ing Jorge Prado (CONFAGAN). Invitados Especiales: Ing Víctor Hugo Fernández Morales (INLAVACA), Dr. Disney Pino (FCV-LUZ). "Foro: Situación y Análisis Prospectivo de la Ganadería Bovina a Nivel Nacional."
- Dra. Rita Tamasaukas, Dr. Sergio Rivera, MSc Gilberto Sánchez, Msc José Francisco Giménez, Lic Cristina Tamasauskas . "Encuentro: Taller sobre la Ganadería Venezolana: Red Venezolana de Ganadería (AMARAIMA RedVenGan-Venezuela).

24. 4to. Congreso Venezolano de Ciencia, Tecnología e Innovación CYTVEN 2015. 4 al 6 de Noviembre de 2015. Círculo Militar. Caracas, Distrito Capital.

- Tamasaukas, Rita, Agudo, Leonel, Rivera, Sergio. "Modelo de Acciones Estratégicas para Programas de Salud Animal Integral (MAFORS) en Fincas Bovinas y Bufalinas de Venezuela."
- Rita Tamasaukas, Leonel Agudo, Jazmín Florio, Josefina Sánchez, Alba Silva, Magdalena Fernández, Sergio Rivera, Margarita Cobo. "Aplicación de Un Modelo de Experimentación para Determinación de Repercusiones Económico-Productivas de la Tripanosomosis en Venezuela".
- Tamasaukas, Rita, Agudo, Leonel, Silva, Alba, Ron, José De Jesús, Rivera, Sergio, Cobo, Margarita. "Caracterización Fenotípica de Bovinos Tripanotolerantes en Fincas Ganaderas Bovinas Doble Propósito del Sistema de Riego Río Guárico, Municipio Miranda, estado Guárico, Venezuela."
- Tamasauskas, Cristina; Florio-Luis de Pineda, Jazmín; Pineda-Graterol, Marcos, Florio de Real, Sunshine; Tamasaukas, Rita. "Propuesta Metodológica para Evaluar Sistemas Agroecológicos de Agricultura Familiar Incorporando la Visión de la Mujer."
- Tamasaukas, Rita; Tamasauskas, Cristina; Ron Jose De Jesus; Sánchez, Gilberto; Rivera, Sergio. "Red Venezolana de Ganadería: la RedVenGan, Movimiento de Actores Relacionados a la Actividad Ganadera, Bajo Enfoque Científico-Tecnológico de Cadena Agroproductiva de Carne y Leche".
- Tamasaukas, Rita; Rivera, Sergio. "Evaluación de Productos Antigénicos Especie-Específicos de *Trypanosoma vivax* para su Aplicación en el Diagnóstico por ELISA de la Tripanosomosis Bovina.

25. Jornadas de Investigación y Extensión de la UNERG. 15 y 16 de Noviembre de 2016, San Juan de los Morros, estado Guárico, Venezuela.

- Rita Tamasaukas, Jazmín Florio-Luis de Pineda, Cristina Tamasauskas, Leonel Agudo-Castellanos, Douglas León, Margarita Cobo, Sergio Rivera. Evaluación en



campo de un ELISA indirecto desarrollado con productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina.

- Rita Tamasaukas, Jazmín Florio-Luis de Pineda, Leonel Agudo-Castellanos, Cristina Tamasaukas, Duglas León, Margarita Cobo, Sergio Rivera. Tetralogía hemotrópica como marcador fenotípico a tripanotolerancia, en ganadería bovina doble propósito en predios del Sur de Aragua, Venezuela.

F. DIAGNÓSTICO PARTICIPATIVO RURAL CON INFORME DE INVESTIGACIÓN-ACCIÓN PARTICIPATIVA: 4

1. Diagnóstico Rural Participativo, Charlas y Conversatorio sobre Hemoparásitos en Venezuela. Lugar: Valle de La Cruz, edo. Aragua. Dirigido a productores y productoras de la Escuela Campesina y Red Socialista de Innovación Productiva de Ganadería Bovina Doble Propósito y Productos Lácteos de Valle La Cruz y Personal de Acompañamiento Técnico y Sociomunitario de FUNDACITE ARAGUA. Fecha: 08 de Noviembre de 2011.
2. Diagnóstico Rural Participativo, Charlas y Conversatorio sobre Hemoparásitos en Venezuela. Lugar: Carmen de Cura, edo. Aragua. Dirigido a productores y productoras de la Escuela Campesina y Red Socialista de Innovación Productiva de Ganadería Bovina Doble Propósito y Productos Lácteos de Carmen de Cura y Personal de Acompañamiento Técnico y Sociomunitario de FUNDACITE ARAGUA. Fecha: 2012.
3. Diagnóstico Rural Participativo, Charlas y Conversatorios sobre Brucelosis y Sanidad Animal. Lugar: Carmen de Cura, edo. Aragua. Dirigido a productores y productoras de la Escuela Campesina y Red Socialista de Innovación Productiva de Ganadería Bovina Doble Propósito y Productos Lácteos de Carmen de Cura y Personal de Acompañamiento Técnico y Sociomunitario de FUNDACITE ARAGUA. Fecha: 2013.
4. Diagnóstico Rural Participativo, Charlas y Conversatorios sobre Probióticos: producción artesanal para la alimentación de becerros. Lugar: Carmen de Cura, edo. Aragua. Dirigido a productores y productoras de la Escuela Campesina y Red Socialista de Innovación Productiva de Ganadería Bovina Doble Propósito y Productos Lácteos de Carmen de Cura y Personal de Acompañamiento Técnico y Sociomunitario de FUNDACITE ARAGUA. Fecha: 2013.

Anexo 2. Corridas en EPIDAT 3.1 . Ejemplos

[1] Pruebas diagnósticas simples



Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	96	4	100
Negativo	3	97	100
Total	99	101	200

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	96,97	93,09	100,00
Especificidad (%)	96,04	91,74	100,00
Índice de validez (%)	96,50	93,70	99,30
Valor predictivo + (%)	96,00	91,66	100,00
Valor predictivo - (%)	97,00	93,16	100,00
Prevalencia (%)	49,50	42,32	56,68
Índice de Youden	0,93	0,88	0,98
Razón de verosimilitud +	24,48	9,37	64,01
Razón de verosimilitud -	0,03	0,01	0,10

[2] Pruebas diagnósticas simples

Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	96	4	100
Negativo	3	97	100
Total	99	101	200

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	96,97	93,09	100,00
Especificidad (%)	96,04	91,74	100,00
Índice de validez (%)	96,50	93,70	99,30
Valor predictivo + (%)	96,00	91,66	100,00
Valor predictivo - (%)	97,00	93,16	100,00
Prevalencia (%)	49,50	42,32	56,68
Índice de Youden	0,93	0,88	0,98
Razón de verosimilitud +	24,48	9,37	64,01
Razón de verosimilitud -	0,03	0,01	0,10

[3] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad: 97,00%
 Especificidad: 96,00%
 Prevalencia: 25,50 x 100



	Valor
Índice de validez (%)	96,26
Valor predictivo + (%)	89,25
Valor predictivo - (%)	98,94

Índice de Youden	0,93
Razón de verosimilitud +	24,25
Razón de verosimilitud -	0,03

[4] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad:	97,00%		
Especificidad:	96,00%		
Prevalencia:	88,65	x	100

	Valor
Índice de validez (%)	96,89
Valor predictivo + (%)	99,47
Valor predictivo - (%)	80,38

Índice de Youden	0,93
Razón de verosimilitud +	24,25
Razón de verosimilitud -	0,03

[5] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad:	99,00%		
Especificidad:	99,00%		
Prevalencia:	88,65	x	100

	Valor
Índice de validez (%)	99,00
Valor predictivo + (%)	99,87
Valor predictivo - (%)	92,69

Índice de Youden	0,98
Razón de verosimilitud +	99,00
Razón de verosimilitud -	0,01

[6] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad:	96,00%		
Especificidad:	97,00%		
Prevalencia:	88,65	x	100

	Valor
--	-------



Índice de validez (%)	96,11
Valor predictivo + (%)	99,60
Valor predictivo - (%)	75,64

Índice de Youden	0,93
Razón de verosimilitud +	32,00
Razón de verosimilitud -	0,04

[7] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad:	97,00%		
Especificidad:	96,00%		
Prevalencia:	88,65	x	100

	Valor
-----	-----
Índice de validez (%)	96,89
Valor predictivo + (%)	99,47
Valor predictivo - (%)	80,38

Índice de Youden	0,93
Razón de verosimilitud +	24,25
Razón de verosimilitud -	0,03

[8] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad:	99,00%		
Especificidad:	99,00%		
Prevalencia:	88,00	x	100

	Valor
-----	-----
Índice de validez (%)	99,00
Valor predictivo + (%)	99,86
Valor predictivo - (%)	93,10

Índice de Youden	0,98
Razón de verosimilitud +	99,00
Razón de verosimilitud -	0,01

[9] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad:	99,00%		
Especificidad:	99,00%		
Prevalencia:	88,80	x	100

	Valor
-----	-----
Índice de validez (%)	99,00
Valor predictivo + (%)	99,87
Valor predictivo - (%)	92,59



Índice de Youden 0,98
 Razón de verosimilitud + 99,00
 Razón de verosimilitud - 0,01

[10] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad: 97,00%
 Especificidad: 96,00%
 Prevalencia: 88,65 x 100

Valor

 Índice de validez (%) 96,89
 Valor predictivo + (%) 99,47
 Valor predictivo - (%) 80,38

Índice de Youden 0,93
 Razón de verosimilitud + 24,25
 Razón de verosimilitud - 0,03

[11] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad: 99,00%
 Especificidad: 99,00%
 Prevalencia: 88,80 x 100

Valor

 Índice de validez (%) 99,00
 Valor predictivo + (%) 99,87
 Valor predictivo - (%) 92,59

Índice de Youden 0,98
 Razón de verosimilitud + 99,00
 Razón de verosimilitud - 0,01

[12] Pruebas diagnósticas simples

Nivel de confianza: 95,0%

Prueba diagnóstica	Prueba de referencia		Total
	Enfermos	Sanos	
Positivo	96	4	100
Negativo	3	97	100
Total	99	101	200
	Valor		IC (95%)
Sensibilidad (%)	96,97	93,09	100,00
Especificidad (%)	96,04	91,74	100,00
Índice de validez (%)	96,50	93,70	99,30
Valor predictivo + (%)	96,00	91,66	100,00



Valor predictivo - (%)	97,00	93,16	100,00
Prevalencia (%)	49,50	42,32	56,68
Índice de Youden	0,93	0,88	0,98
Razón de verosimilitud +	24,48	9,37	64,01
Razón de verosimilitud -	0,03	0,01	0,10

[13] Pruebas diagnósticas simples

Sensibilidad:	97,00%	
Especificidad:	96,00%	
Prevalencia:	88,65	x 100

	Valor
-----	-----
Índice de validez (%)	96,89
Valor predictivo + (%)	99,47
Valor predictivo - (%)	80,38
Índice de Youden	0,93
Razón de verosimilitud +	24,25
Razón de verosimilitud -	0,03

[14] Curvas ROC simples

Número de tablas:	2
Nivel de confianza:	95,0%