

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Diagnosis and molecular characterization
of natural cattle infections produced
by *Trypanosoma* spp. in the
Colombian Orinoco region

Diagnóstico y caracterización
molecular de infecciones naturales
por *Trypanosoma* spp. en bovinos
de la Orinoquía Colombiana

Elizabeth Regina Cassalet B.¹, Víctor Julio V.²,
Jorge Luis Parra A.¹, Rita Mercedes Baldrich F.³

ABSTRACT

Because of the limitations of direct methods for the diagnosis of trypanosomes in small quantities, molecular methods which allow identification of the species with a small amount of parasite DNA were analyzed. A study was conducted at the Carimagua Experimental Station, located in the flat high plains of Orinoco Colombia. From 500 'Sanmartinero' and 'Zebú' breeding cattle, native to the area, 70 clinically healthy animals were randomly selected, to establish the presence of *Trypanosoma* spp. and to perform differential diagnosis between species. Blood samples were taken and linfocytes were separated by the Buffy Coat technique. Semi-nested PCR was performed on the 18S rDNA region. RFLP was run on the obtained products and a comparison with international standards was made. Five samples were positive for *Trypanosoma* spp. by PCR. One of them corresponded to *T. vivax* and four to *T. theileri*. The results obtained estimate a prevalence of 7.14% in apparently healthy animals, otherwise not detected by traditional direct tests currently in use. This poses a potential problem for cattle in the area, given the chance of developing clinical symptoms of the disease and the likelihood of transmission to susceptible animals. Having methods to detect presence of the species *Trypanosoma* spp., also permits better management and understanding of the field problem. The methods described are the first molecular approach to study *Trypanosoma* spp. in cattle in the Colombian Orinoco region and highlight the importance of diagnosis of the disease.

Keywords: hemoparasites, PCR, RFLP, herbs, diagnosis of diseases.

RESUMEN

Debido a las limitaciones que tienen los métodos directos para el diagnóstico de tripanosomas en bajas cantidades, los métodos moleculares permiten la identificación de la especie con una pequeña cantidad del ADN del parásito. Se realizó un estudio en la Estación Experimental Carimagua ubicada en la altillanura plana de la Orinoquía Colombiana, con una población de 500 bovinos de cría de las razas Cebú y Sanmartinero nacidos en la zona, se seleccionaron de manera aleatoria 70 animales clínicamente sanos, con el fin de establecer la presencia de *Trypanosoma* spp. y realizar un diagnóstico diferencial entre especies. Se tomaron muestras de sangre en las cuales, se separaron glóbulos blancos mediante la técnica de Buffy Coat, y se realizó PCR semi-anidado sobre la región 18S del rDNA. Sobre los productos obtenidos se realizó el RFLPs y su comparación con estándares internacionales. Cinco muestras por PCR fueron positivas a *Trypanosoma* spp., de las cuales una correspondió a *T. vivax* y 4 a *T. theileri*. Los resultados obtenidos permiten estimar sobre la población analizada, una prevalencia del *Trypanosoma* spp. de 7,14 % en animales aparentemente sanos, no diagnosticables por pruebas de detección directa usadas tradicionalmente, lo que constituye un potencial problema para la ganadería bovina de la zona, dada la posibilidad de desarrollar cuadros clínicos de la enfermedad y de su potencial transmisibilidad a animales susceptibles. Contar con métodos que determinen especies del *Trypanosoma* spp., permitirá igualmente un mejor manejo y comprensión del problema de campo. Las metodologías descritas, son la primera aproximación molecular de *Trypanosoma* spp. realizada en ganaderías de la Orinoquía Colombiana y ponen de manifiesto su importancia en el diagnóstico de la enfermedad.

Palabras clave: hemoparásitos, PCR, RFLP, ganadería, diagnóstico de enfermedades.

Fecha de recepción 2010-10-11
Fecha de aceptación 2010-11-29

¹ Grupo de Salud Animal. Centro de Investigación La Libertad, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - Corpoica. Villavicencio (Colombia). ecassalett@corpoica.org.co; jparra@corpoica.org.co

² Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia). instituto_genetica@yahoo.com

³ Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá (Colombia). rbaldrich@latinmail.com

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomosis es una enfermedad hemoparasitaria de importancia económica, causada por el protozoo *Trypanosoma* spp., que afecta extensas áreas en África y Sur América, ocasionando pérdidas en la industria ganadera. La forma aguda de la enfermedad se presenta con fiebre, anemia, emaciación, aborto en el último tercio de la gestación, disminución tanto de peso como en producción de leche. La tripanosomosis generalmente cursa en forma crónica en los climas tropicales y subtropicales del mundo, caracterizada por anemia y enflaquecimiento progresivo, lo que da lugar al estado de portador asintomático que puede difundir y perpetuar la enfermedad (Plata, 1931; Herrera *et al.*, 2005; Adamuz, 2009; García *et al.*, 2009).

En Colombia se han reportado las especies *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma theileri*, siendo endémicas las zonas de la Costa Atlántica, Valles Interandinos y Piedemonte Llanero (Wells *et al.*, 1970; Betancourt, 1978; Ramírez *et al.*, 1979; Wells *et al.*, 1982; Otte, 1991; Villar *et al.*, 2000), con una presencia importante del parásito en regiones como el Valle del Cauca y Magdalena medio (Jones y Dávila, 2001). La Orinoquía Colombiana cuenta con una población estimada de 4,5 millones de cabezas de ganado bovino en 17 millones de ha, dedicadas prioritariamente a la producción de carne, donde el *Trypanosoma evansi* presenta una alta prevalencia tanto en equinos (68,18%), como en bovinos (7,02%) y chigueros (10%), y el *T. vivax* ha presentado en fincas del Piedemonte una prevalencia del 50% (Villar *et al.*, 2000), determinados por métodos parasitológicos directos y serológicos indirectos.

Mientras que los métodos parasitológicos directos para diagnóstico de tripanosomas y otros hemoparásitos, tienen limitaciones para detectar parasitemias bajas, especialmente en infecciones crónicas, los métodos moleculares ofrecen como ventajas una pequeña cantidad de DNA del parásito, identifican la especie independientemente de su morfología, patogenicidad, hospedero y distribución geográfica, permiten evaluar relaciones genéticas, discriminar relaciones entre especies y subespecies, sirven como marcadores taxonómicos para los *Trypanosomatidae* (Ventura *et al.*, 2002), y son la base de nuevos e importantes métodos para la epidemiología y la filogenia (Prichard y Tait, 2001; Adamuz, 2009; Tamasaukas *et al.*, 2010).

Dada la importancia de la tripanosomosis en la ganadería Colombiana, los métodos moleculares son herramientas necesarias para el diagnóstico del *Trypanosoma*, basado en el reconocimiento y amplificación de la secuencia del DNA del parásito, siendo mucho más sensibles que los métodos de diagnóstico microscópico (Holland *et al.*, 2002; Adamuz, 2009), y que las técnicas serológicas como la inmunofluorescencia (IFAT), y la técnica de ELISA, utilizadas en forma amplia en el diagnóstico de esta enfermedad (Eisler *et al.*, 1998; García *et al.*, 2009; Tamasaukas *et al.*, 2010), las cuales tienen como limitante la dificultad de diferenciar entre infecciones clínicas de la enfermedad e infecciones resueltas o crónicas.

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite la detección de parásitos por debajo del límite de detección comúnmente utilizado en técnicas parasitológicas microscópicas. Es así, como investigaciones para la detección de *Trypanosoma* han sido desarrolladas usando pruebas de hibridación especie-específica con DNA nuclear (Desquesnes y Dávila, 2002; Masiga *et al.*, 2000; Morlais *et al.*, 2001; Tamasaukas *et al.*, 2010) para determinar genotipos entre especies, al igual que utilizando secuen-

cias de DNAC en combinación con la técnica de ELISA, donde el antígeno es reconocido por un anticuerpo monoclonal (Chansiri *et al.*, 2002; García *et al.*, 2009).

Las secuencias de genes de ADN ribosomal (rDNA) o de sus constituyentes en copias múltiples, da la posibilidad de abordar bajo pruebas moleculares los valores de sensibilidad y especificidad (Prichard y Tait, 2001; Delespaux *et al.*, 2003; Geysen *et al.*, 2003; Malele *et al.*, 2003; Tamasaukas *et al.*, 2010). Investigaciones llevadas a cabo por Desquesnes *et al.* (2001), quienes a través de la técnica de PCR utilizaron los espacios internos de transcripción (ITS) del rDNA, amplificando el ITS1 situada entre los genes rRNA 18S y 5.8S, mostraron diferencias entre especies, con cierta disminución en la detección, cuando se presentaban infecciones combinadas de *T. vivax* y *T. brucei*, siendo una herramienta potencial para el diagnóstico especie-específico. Geysen *et al.* (2003), implementaron la utilización de secuencias conservadas específicas del gen 18S de la SsrDNA del *Trypanosoma*, demostrando que es un método altamente específico ante infecciones cruzadas con cepas de *T. vivax*, *T. brucei*, *T. congolense*, *T. theileri* y *T. simiae*.

El conocimiento sobre las características moleculares, mediante técnicas de PCR-RFLPs, altamente sensibles y específicas, de cepas nativas de *Trypanosoma* spp., que circulan naturalmente en los sistemas de producción de cría y doble propósito del trópico bajo, es útil para un mejor entendimiento de la epidemiología del hemoparásito. La determinación con mayor certeza de individuos positivos en una población, al igual que de la prevalencia de especies, su bioecología e importancia económica, permiten la conformación de paquetes integrados de control parasitario, que mejoren la salud de los animales y reduzcan el impacto de la enfermedad en la ganadería nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población bovina analizada

Se efectuó un estudio seccional cruzado (1), en los bovinos del Centro de Investigaciones Carimagua situado a 100 km del municipio de Puerto Gaitán, en la Altillanura Plana Colombiana en el departamento del Meta (Colombia), que tenía una población bovina aproximada de 500 animales adultos, con cuatro subpoblaciones definidas en tres del tipo racial cebú comercial, originarias de Puerto López, Puerto Gaitán y Carimagua, y una subpoblación bovina criolla Sanmartinera nativa de Carimagua.

Se hizo un muestreo aleatorio de sangre con anticoagulante, a 70 bovinos adultos, aparentemente sanos, distribuyendo la muestra en forma proporcional dentro de cada una de las cuatro subpoblaciones, independientes de la

condición sexual, obtenidos de la siguiente fórmula de muestreo (Thrusfield *et al.*, 2001):

$$n = (p \times q \times Z^2) / (EE)^2$$

n = tamaño de la muestra

p = prevalencia estimada, tomada de Villar *et al.* (2000) de 7,5 %

q = 1-p

Z = intervalo de confianza 95%, Z = 1,96

(EE) = Error estándar estimado o precisión 6,5%

n = $(0,075 \times 0,925 \times 3,8416) / (0,065)^2$; n = 63 muestras

n se incrementó en 10% = n x 1,10 = 69 muestras llevando el número final a 70.

Recolección de las muestras en campo

A los individuos seleccionados, se les recolectó 20 mL de sangre de la vena yugular, distribuidos en 2 tubos, uno con anticoagulante EDTA y otro sin anticoagulante. El estabilizante se preparó con la sangre tratada con EDTA a una relación de 100 mL de EDTA/ mL de sangre, la cual a su vez es tratada con dimetil sulfoxido al 20% (DMSO, Merck-Schuchardt, Alemania) en relación 1:4 (v/v). La sangre fue distribuida en viales para ser congelada en nitrógeno líquido a -196°C. Igualmente, a cada uno de los animales muestreados, se les realizó un extendido de sangre en placa con tinción de Giemsa. Estas láminas tenían como fin poder observar y confirmar la presencia del *Trypanosoma*, en aquellos animales que dieran positivos en las pruebas moleculares.

De la misma manera, se tomaron muestras de sangre para la prueba de Buffy Coat o Método Murray (Murray *et al.*, 1977) y el contenido del tubo capilar fue depositado en papel filtro Whatman No. 3, y conservadas en nitrógeno líquido a -196°C. Estas muestras se destinaron para efectuarles una amplificación por medio de la PCR con el fin de determinar la presencia del parásito, y en aquellas que se obtuvieron amplificaciones, se efectuó digestión por medio del método de RFLPs.

Examen directo

El tubo capilar que se tomó para Buffy Coat, fue inicialmente examinado bajo microscopio con objetivo 100X, para determinar la presencia del parásito (trypanosomas y microfilarias). Una vez realizado este procedimiento de prueba de Woo (1972), el contenido del tubo capilar se depositó en Papel Whatman No. 3 para su posterior proceso molecular de extracción de ADN.

Las muestras que resultaron positivas a los procesos moleculares, se les efectuó un chequeo de los extendidos de

sangre en láminas preparados en el momento de la recolección en campo, con el fin de verificar si había presencia del parásito y efectuar el análisis morfométrico respectivo.

Extracción de ADN

La extracción del ADN fue realizada siguiendo el protocolo de Geysen *et al.* (2003), modificado por Cassalet (2006). Se tomaron trozos pequeños de papel filtro Whatman No. 3 que contenía una porción de la muestra de sangre, la cual se transfirió a tubos eppendorf con 500 µL de agua destilada. Las muestras se mezclaron tres veces en vortex con intervalos de 15 min; luego fueron centrifugadas a 11.000 rpm por 10 min y se colocaron en baño María entre 92- 98°C durante 8 min, después de lo cual se realizó otra centrifugación a 11.000 rpm durante 5 min. Las muestras fueron mezcladas en vortex por 2 min y conservadas a 4°C para ser utilizadas en la amplificación.

PCR semi-anidado

La amplificación del DNA se efectuó a través de una PCR semi-anidada, usando dos set de *primers* género específicos (Tabla 1), los cuales amplificaron una región del gen 18S rDNA de *Trypanosoma*. El primer 18ST nF2 y el primer reverso 18ST nR3 fueron utilizados para amplificar entre 700 a 800 pb de la región 18S rDNA, en una reacción de 25 µL. Para ello se mezclaron 5 µL de muestra de DNA, 50nM de KCl, 10nM Tris-HCL (pH 8,3), 1,5 nM MgCl₂, 200 µM por cada dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfatos), 20 pmol de cada *primer* y 0,5 U de enzima Taq polimerasa (Promega® M166B).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de los *primers* utilizados para detectar *Trypanosoma* en este estudio.

Nombre <i>primer</i>	Secuencia de oligonucleótidos (5' → 3')
18ST nF2	CAACGATGACCCCATGAATTGGGGA
18ST nR3	TGCGGACCAATAATTGCAATAC
18ST nR2	GTGTCTGTCTCACTGACATTGTAGTG

La mezcla de 25 µL, se ubicó en el termociclador cuyo programa de amplificación, se fundamentó en desnaturación durante 4 min a 94°C; cada 40 ciclos consistieron en 60 s a 94°C, 90 s a 58°C y 120 s a 72°C. En el programa se adicionaron 10 min de extensión a 72 °C y posteriormente a 4°C hasta retirar la muestra. De cada muestra, se tomaron 5 µL que se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, el cual fue teñido con 5 µL de bromuro de etidio. En la cámara de electroforesis las muestras estuvieron por 30 min a 100 V (Geysen *et al.*, 2003).

Después de la primera amplificación se utilizó el set de *primers* 18ST nF2 y 18ST nR3 como *primer* reverso con el

fin de amplificar sitios blanco internos de los productos de la primera amplificación. Del producto de la primera amplificación, se tomó 1 μ L y se adicionó a 24 μ L de la master mix, la cual se encontraba compuesta de 17,75 μ L de agua, 2,5 μ L de Buffer de carga, 1,5 μ L de $MgCl_2$, 1,25 μ L de dNTPs, 0,25 μ L de cada *primer* y 0,5 μ L de la enzima Taq polimerasa. El programa de la segunda amplificación, fue idéntico al de la primera amplificación, excepto por 25 ciclos. Se tomaron 5 μ L del producto de la segunda amplificación, se sometieron a electroforesis en minigeles de 2% de agarosa, teñidas con 5 μ L de bromuro de etidio con una escala de 100 bp de DNA para la determinación del tamaño del fragmento. Las muestras fueron corridas por 30 min a 100 V, y fotografiadas bajo iluminación UV (Geysen *et al.*, 2003).

Se sembró en gel de agarosa al 2%, una muestra de control positivo con DNA de las cepas de *Trypanosoma* del Banco de Germoplasma de Microorganismos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) procedentes de Puerto Gaitán, Puerto López y Carimagua, trabajadas y analizadas previamente (Cassalett, 2006), y un control negativo con DNA de *Babesia bigemina*.

Digestión de los productos del PCR semi-anidada

Los productos de las amplificaciones de la PCR semi-anidada fueron digeridos por las enzimas de restricción MspI y Eco57I. Las enzimas utilizaron un buffer Y+/Tango con S-adenosylmethionina de acuerdo con la especificaciones del fabricante (Gibco[®], UK) usando 10U/ μ g de DNA (0,6 U/ μ L de producto de PCR) sobre 6 μ L de DNA amplificado en un volumen total de 15 μ L. La reacción se dejó toda la noche en baño de maría a 37°C. Pasado este tiempo, 8 μ L de la muestra restringida, se mezcló con una carga de 2 μ L de buffer, para posteriormente ser transferida al gel de agarosa al 2,5% con una escala de 100 bp de DNA para la determinación del tamaño de los fragmentos. Los fragmentos de DNA fueron posteriormente separados por electroforesis horizontal en buffer TAE 1X a 100 V por 1,5 h. El gel se tiñó usando SYBR-Green (SYBR Safe Invitrogen S33102 1000X) con el fin de observar las digestiones respectivas de las cepas de *T. vivax*, *T. evansi* y *T. theileri*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Examen directo

Al examen directo de los extendidos de sangre coloreados con Giemsa y las muestras del Buffy Coat del tubo capilar, tomados de los 70 animales experimentales, no se observaron *Trypanosomas* spp.

PCR

De las 70 muestras de campo analizadas con la PCR semi-anidada, 5 (7,14%) resultaron positivas a *Trypanosoma* (CO34NL; H44V; G10NL; G4NL; C4NL), mostrando amplificaciones entre 700 a 800 pb para la primera amplificación y entre 600 a 700 pb en la segunda, demostrándose que la PCR es una herramienta altamente sensible ya que detecta contenidos de DNA hasta de un solo parásito (Ventura *et al.*, 2002) a partir de muestras de campo (Figura 1).

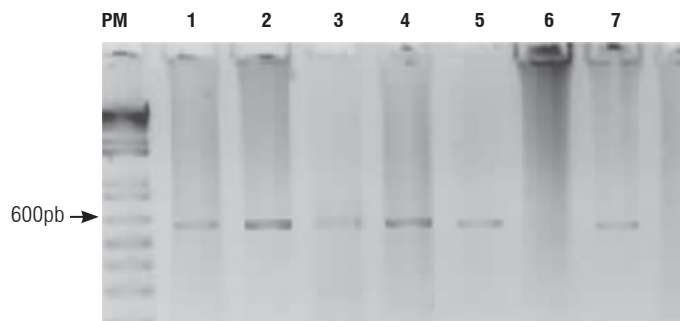


Figura 1. PCR semi-anidada de muestras bovinas recolectadas por medio de Buffy Coat papel filtro. CO34NL (Línea 1); H44V (Línea 2); G10NL (Línea 3); C4NL (Línea 4); G4NL (Línea 5); Control negativo DNA *Babesia bigemina* (Línea 6); Control positivo DNA *Trypanosoma theileri* (Línea 7). Los productos fueron separados en minigeles de agarosa al 2% y fue incluido en un extremo del gel un marcador de peso de 1 Kb plus DNA.

Las muestras positivas a *Trypanosoma* eran procedentes de Puerto Gaitán, Puerto López y Carimagua, lo que confirma que en la Orinoquía colombiana, la presencia del *Trypanosoma*, sigue siendo vigente, cobrando mayor importancia, los estudios realizados desde los años 70 hasta el 2000, donde se contemplaba la Orinoquía con una prevalencia serológica alta (Betancourt, 1978; Wells *et al.*, 1982; Villar *et al.*, 2000).

Las cinco muestras que amplificaron con la PCR semianidada, fueron sometidas a digestión con las enzimas MspI y Eco57I, las cuales son específicas según Geysen *et al.* (2003), para diferenciar especies de parásitos del género *Trypanosoma*.

Los resultados permitieron observar patrones que determinaron como positivos a *T. theileri* 4 muestras a (CO34NL; H44V; G10NL y C4NL) y a la especie *T. vivax* 1 muestra (G4NL), demostrando así (Figura 2), que la técnica complementaria a la PCR semi-anidada tiene un alto valor diagnóstico para evaluar una población bovina determinada, e igualmente coincide con los resultados obtenidos con las cepas trabajadas del Banco de Germoplasma de microorganismos.

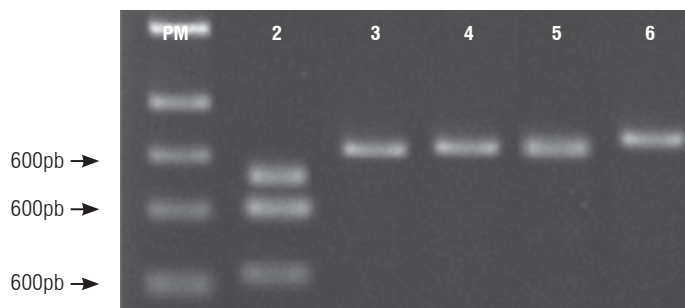


Figura 2. Análisis de RFLP con enzimas de restricción *Msp1* y *Eco571* digestión de la 18Ssu-rDNA de muestras bovinas. G4NL (línea 2); CO34NL (línea 3); H44V (línea 4); C4NL (línea 5); G10NL (línea 6). Los productos fueron separados en minigeles de agarosa al 2,5% y fue incluido en un extremo del gel un marcador de peso de 1 Kb plus.

CONCLUSIONES

Con el empleo de PCR-RFLPs para el diagnóstico de la tripanosomiasis en bovinos de campo se detectó un 7,14% de animales positivos, que las técnicas de extendidos de sangre y Woo no evidenciaron. Lo anterior coincide con lo anotado por Magona *et al.* (2003), quienes establecieron animales positivos entre 33% a 78% por exámenes directos en comparación con 91-100% por PCR-RFLPs en ganado cebú, debido a que por PCR-RFLPs, se puede detectar menos de 1 tripanosoma/mL de sangre parasitada, mientras con las técnicas clásicas se requieren más de 1000 tripanosomas/mL de sangre (Woo, 1972; Murray *et al.*, 1977; Jones y Dávila, 2001).

La detección del *Trypanosoma* por PCR-RFLPs en animales cuyo diagnóstico por técnicas directas fue negativo, permitió establecer la presencia de animales positivos, independiente de los niveles de parasitemia en que tenían. En el curso de la infección por *Trypanosoma* se ha determinado que, en las infecciones crónicas o en los periodos de latencia que suelen seguir a los ataques agudos de la enfermedad (Dirie *et al.*, 1993), los niveles de parasitemia son muy bajos e indetectables por métodos directos convencionales, ya que los *Trypanosomas* se alojan en capilares profundos de algunos órganos hematopoyéticos (Plata, 1931), para presentar después una reactivación con aumento de la parasitemia. Esta situación es frecuente en poblaciones bovinas ubicadas en zonas endémicas de la enfermedad como es la región natural de la Orinoquía Colombiana, estableciéndose así, la presencia de portadores asintomáticos del parásito, generando una problemática difícil de resolver mediante la implementación exclusiva en campo de pruebas parasitológicas clásicas.

Está por definirse el papel que asumen en la epidemiología de la tripanosomiasis, los animales que mantienen parasitemias bajas, los cuales en su momento, pueden ser

considerados portadores asintomáticos de la enfermedad. De acuerdo con los resultados obtenidos, puede darse una situación biológica, donde no se detecta la presencia del parásito con diagnóstico parasitológico directo, pero son positivos mediante PCR-RFLPs.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, la altillanura plana colombiana, se puede considerar una zona donde prevalecen diferentes especies de tripanosomas, debido a que las muestras que resultaron positivas a este parásito por medio de PCR-RFLPs eran de animales procedentes de Puerto López y Puerto Gaitán, departamento del Meta, Colombia.

La diferenciación entre especies de *Trypanosoma* por PCR-RFLPs, permitirá un mejor manejo epidemiológico de la enfermedad en Colombia, en particular en la Orinoquía Colombiana, dada la importancia que la diferenciación entre especies, determinará igualmente las medidas de prevención y control a emplear, debido a que el *T. vivax* presenta mayores problemas clínicos que el *T. evansi* o *T. theileri*, este último considerado apatógeno (Villar *et al.*, 2000; Otte, 1991; Ventura *et al.*, 2002; García *et al.*, 2009).

Aunque el PCR-RFLP es una técnica de alta sensibilidad, algunos autores han tenido dificultad en establecer diferencias entre especies cuando han amplificado las regiones ITS1 y Ssu del rDNA (Delespau *et al.*, 2003; Njiru *et al.*, 2005; Thekisoe *et al.*, 2005; Hamilton *et al.*, 2005; Desquesnes *et al.*, 2001), logrando una mayor sensibilidad en establecer la presencia del parásito, mas no su especie; con los primers 18ST nF2 y 18ST nR2 que amplifican la región Ssu del rDNA (Geysen *et al.*, 2003) igualmente empleados en el presente trabajo, se pueden detectar infecciones mixtas, lo que permite recomendar su uso para determinar prevalencias y distribución geográfica de la enfermedad.

Así mismo, con el método utilizado de PCR-RFLP se pudo diferenciar claramente la especie de *T. vivax* de la especie *T. evansi*, lo cual había representado una limitante en estudios previos (Desquesnes *et al.*, 2001; Dávila *et al.*, 2003; Ventura, 2002), lo que no permitía trabajar muestras con infecciones mixtas. Por lo tanto, se adiciona una ventaja comparativa de este método, descrito por Geysen *et al.* (2003), con relación a los otros métodos probados.

El método de Buffy Coat a partir de muestras de sangre en papel filtro, ofreció una mejor concentración de *Trypanosomas* de campo, lo que permitió igualmente obtener cantidades adecuadas de DNA para el PCR-RFLPs, a diferencia del empleo de sangre completa de animales parasitados; este tipo de método en muestras de campo, fue igualmente establecido como eficiente para obtener cantidades de ADN adecuadas por Machila *et al.* (2001).

No hay información bibliográfica de otro trabajo realizado en Colombia sobre tripanosomosis empleando PCR-RFLPs. Este estudio permitió determinar género y especie de *Trypanosoma* en bovinos, aparentemente sanos, de la Orinoquía Colombiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamuz J. 2009. Identificación fenotípica y genotípica de 74 nuevos aislados de Tripanosomátidos de seis países de Latinoamérica y España [Tesis de doctorado]. Granada: Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. 283 p.
- Betancourt A. 1978. Studies on the epidemiology and economic importance of *Trypanosoma vivax*, 1905, in Colombia [Tesis de doctorado]. College Station, TX: Texas A & M University.
- Cassalett E. 2006. Tipificación molecular por PCR - RFLPs de cepas de *Trypanosoma* sp. aisladas en campo y evaluación de ganados de la Orinoquía Colombiana [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 115 p.
- Chansiri K, Khuchareontawong S, Sarataphan N. 2002. PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animals and vector. *Mol Cel Probes* 16:173-177.
- Dávila AMR, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS, Traub-Cseko YM. 2003. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 117:1-13.
- Delespau V, Ayral F, Geysen D, Geerts S. 2003. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. *Vet Parasitol* 117:185-193.
- Desquesnes M, McLaughlin G, Zougrana A, Dávila AM. 2001. Detection and identification of *Trypanosoma* of American livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int J Parasitol* 31:610-614.
- Desquesnes M, Dávila AMR. 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes; a review and perspectives. *Vet Parasitol* 109:213-231.
- Dirie MF, Otte MJ, Thatthi R, Gardiner PR. 1993. Comparative studies of *Trypanosoma vivax* isolates from Colombia. *Parasitol* 106:21-29.
- Eisler MC, Lessard P, Masake RA, Moloo SK, Peregrine AS. 1998. Sensitive and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Vet Parasitol* 79:187-201.
- García H, Rangel-Rivas A, Contreras 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.
- Geysen D, Delespau V, Geerts S. 2003. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet Parasitol* 110: 171-180.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson W. 2005. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (*Haemadipsidae*). *Int J Parasitol* 35(4):431-443.
- Herrera HM, Norek A, Freitas TP, Rademaker V, Fernandes O, Jansen AM. 2005. Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. *Parasitol Res* 96(2):121-127.
- Holland WG, Thanh NG, My LN, Magnus E, Verloo D, Büscher P, Goddeeris B, Vercruyse J. 2002. Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper disc in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Tropica* 81:159-165.
- Jones TW, Dávila AMR. 2001. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *TRENDS in Parasitol* 17(2):99-101.
- Machila N, Sinyangwe L, Mubanga J, Hopkins JS, Robinson T, Eisler MC. 2001. Antibody-ELISA seroprevalence of bovine trypanosomosis in the Eastern Province of Zambia. *Prev Vet Med* 49:249-257.
- Magona JW, Mayende JS, Olaho-Mukani W, Coleman PG, Jonsson NN, Welburn SC, Eisler MC. 2003. A comparative study on the clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomosis in Uganda. *Onderstepoort J Vet Res* 70(3):213-218.
- Malele I, Craske L, Knight C, Ferris V, Njiru Z, Hamilton P, Lehane S, Lehane M, Gibson W. 2003. The use of specific and generic primers to identify trypanosome infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. *Infect Genet Evol* 3(4):271-279.
- Masiga DK, Ndung K, Turner M. 2000. An analysis of genetic variability in *Trypanosoma evansi* using amplified restriction fragment length polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Mol Biochem Parasitol* 42:265-279.
- Morlais I, Ravel S, Grébaud P, Dumas V, Cuny. G. 2001. New Molecular Marker for *Trypanosoma (Dunotella) vivax* identification. *Acta Trópica* 80:207-213.
- Murray M, Murray PK, McIntyre WIM. 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:325-326.
- Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Dávila AM. 2005. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res* 95(3):186-192.
- Otte MJ. 1991. La importancia de la Tripanosomiasis en la industria ganadera de Córdoba, Colombia. Informe Técnico N° 8, Proyecto Colombo-Alemán, Bogotá: Instituto Colombiano Agropecuario-ICA; Agencia de Cooperación Técnica Alemana-GTZ. 151 p.
- Plata R. 1931 Los portadores latentes de la tripanosomiasis bovina. *Rev Med Vet* (3):213-217.
- Prichard R, Tait A. 2001. The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Vet Parasitol* 98:169-194.
- Ramírez LE, Wells EA, Betancourt A. 1979. Epidemiología del *Trypanosoma evansi* con especial referencia a Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 1(4):319-333.
- Tamasaukas R, Agudo-Castellanos L, Silva-Ravelo A, Florio-Luis J, Vintimilla-Tamasaukas M, Ribera-Pirela S. 2010. Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Agron Mesoam* 21(2):367-381.
- Thekisoe OM, Inoue N, Kuboki N, Tuntasuvan D, Bunnoy W, Borisutsuwan S, Igarashi I, Sugimoto C. 2005. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. *Vet Parasitol* 130(3-4):327-330.
- Thrusfield M, Ortega C, de Blas I, Noordhuizen JP., Frankena K. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet Rec* 148: 567-572.
- Ventura RM, Takeda GF, Silva RA, Nunes VL, Buck GA, Teixeira MM. 2002. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *Int J Parasitol* 32:53-63.
- Villar C, Sánchez VH, Parra JL. 2000. Estrategias para el control de parásitos en bovinos del departamento del Guaviare. *Boletín Técnico* 22. Villavicencio: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica. 36 p.
- Wells EA, Betancourt A, Page WA. 1970. The epidemiology of bovine trypanosomiasis in Colombia. *Trop Anim Health Prod* 2:111-125.
- Wells EA, Ramirez LE, Betancourt A. 1982. *Trypanosoma vivax* in Colombia. Interpretation of field results. *Trop Anim Health Prod* 14:141-150.
- Woo PTK. 1972. Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis. *Acta Tropica* 28:298-303.