

SEROPREVALENCIA DE TRIPANOSOMOSIS BOVINA DETERMINADA POR ELISAI POSTERIOR AL TRATAMIENTO PROFILÁCTICO CON ISOMETAMIDIUM EN UN HATO DEL MUNICIPIO MUÑOZ DEL ESTADO APURE, VENEZUELA

Seroprevalence of Bovine Trypanosomosis Determined by ELISAI Post Prophylactic Isometamidium Treatment in a Farm at Muñoz County, Apure State, Venezuela

Ariadna Rangel-Rivas¹, Francia Reyes² y Alfredo Mijares^{1*}

¹Laboratorio de Fisiología de Parásitos, Centro de Bioquímica y Biofísica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Carretera Panamericana, Km. 11. 20632. Caracas 1020A, Venezuela.

²Laboratorio de Bioquímica e Inmunología de Hemoparásitos, Universidad Simón Bolívar. Baruta 1086, Venezuela. Telf: 58 212 5041853 Fax: 58 212 5041093. amijares@ivic.gob.ve / mijaresa@gmail.com

RESUMEN

La tripanosomosis bovina genera anualmente cuantiosas pérdidas económicas en la producción ganadera del país. Algunas explotaciones de tipo extensivo han establecido planes anuales de control de estos hemoparásitos, los cuales consisten en la aplicación profiláctica de fármacos tripanocidas. Con la finalidad de evaluar la variación de la seroprevalencia de *Trypanosoma* spp. después de una aplicación de clorhidrato de cloruro de isometamidium al 2%, fueron muestreados un grupo de 513 novillas *Bos indicus* Linnaeus, 1758, en un hato ganadero del municipio Muñoz del estado Apure, Venezuela. Se realizaron cuatro muestreos equidistantes en un período de nueve meses. Una semana antes de la primera toma de muestras se le aplicó a cada uno de los animales una dosis de 1 mg/kg del compuesto. Una vez en el laboratorio, las muestras de suero sanguíneo fueron analizadas mediante ensayos de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISAI), de tipo indirecto, empleando como antígeno un extracto purificado de *Trypanosoma evansi*. Los ensayos fueron realizados previamente en el laboratorio según protocolo estandarizado. Se obtuvieron los siguientes porcentajes de seroprevalencia: 75,60% (diciembre 2009), 57,60% (marzo 2010), 41,60% (junio 2010) y 53,40% (septiembre 2010). Los resultados mostraron una alta seroprevalencia de tripanosomosis al momento de aplicar el tratamiento profiláctico, la cual fue disminuyendo en los meses

sucesivos para luego sufrir un ligero aumento, posterior a los seis meses de la aplicación de tratamiento, sin embargo, no se registraron casos clínicos de la enfermedad, ni la presencia del parásito mediante pruebas diagnósticas directas. Se recomienda continuar con la evaluación periódica de los animales y considerar como una medida sanitaria preventiva la rotación del compuesto activo empleado.

Palabras clave: Tripanosomosis, profilaxis, seroprevalencia, ELISA, isometamidium.

ABSTRACT

Bovine trypanosomosis generates annual economic losses in livestock production in the country. Some farms that have an extensive cattle production, have established a control annual plan of hemoparasites which involve the application of prophylactic trypanocidal drugs. In order to evaluate the variation of seroprevalence after an annual application of isomethamidium chloride hydrochloride 2%, a group of 513 heifers of *Bos indicus* Linnaeus, 1758 was sampled, in a herd of Muñoz County of Apure State, Venezuela. Four samples were carried out in an equally spaced over a period of nine month. A week before the first sampling was applied to each animal a dose of 1 mg/kg of the drug. Once at the laboratory, samples were analyzed by ELISA indirect testing using as antigen a purified extract of *Trypanosoma evansi*. The test was performed according to previously standardized protocol in the laboratory. The seroprevalence obtained for the different samples studied were expressed as percentages of positive animals: 75.60% (De-

ember 2009), 57.60% (March 2010), 41.60% (June 2010) and 53.40% (September 2010). The results showed a high seroprevalence when prophylactic treatment was applied, which was decreasing in the following months and then suffer an light increase, after six months of treatment application, however, no cases of clinical disease or the presence of the parasite by direct diagnostic tests were observed. It is recommended, to continue with regular assessment of animals and considered as a preventive health measure the rotation of the active compound employed.

Key words: Trypanosomosis, prophylaxis, seroprevalence, ELISA, isometamidium.

INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis bovina, conocida comúnmente como secadera, huequera o cacho hueco [9] es una enfermedad parasitaria producida por *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax* Ziemann, 1905, que afecta a bóvidos (Bovidae: Artiodactyla) rumiantes de rebaños vacunos (*Bos taurus* y *B. indicus* Linnaeus, 1758), bufalinos (*Bubalus bubalis* Kerr, 1792), ovinos (*Ovis* spp. L., 1758) y caprinos (*Capra* spp. L., 1758). Los signos clínicos que presentan los animales afectados por tripanosomosis son muy similares a los observados en cualquier enfermedad provocada por otros agentes hemotrópicos o en enfermedades que cursen con estados febriles intermitentes, decaimiento, pérdida de peso, disminución de la producción y aumento de secreción glandular (principalmente de las glándulas lagrimales), entre otros. Por lo tanto, la experiencia del veterinario a cargo y las pruebas de laboratorio son importantes a la hora de realizar el diagnóstico correspondiente y establecer programas de tratamiento y control de esta enfermedad.

El tratamiento curativo, en casos agudos y crónicos de la enfermedad, va dirigido a la eliminación del parásito, mediante la administración de drogas tripanocidas, como: diminaceno, quinapiramina y fenantridinas y a dar soporte al animal afectado mediante agentes terapéuticos que produzcan un aumento del número de eritrocitos y/o de la concentración de hemoglobina en estas células (Ej. hierro y vitaminas del complejo B), fluidoterapia y buena alimentación. Por otra parte, cuando el patógeno produce casos de infección subaguda, manteniéndose de manera enzoótica en el rebaño se suele implementar el uso de drogas tripanocidas de forma profiláctica, principalmente quinapiramina y fenantridinas. Sin embargo, su uso prolongado ha dado paso a la supervivencia de cepas resistentes [9, 11]. De estas drogas, el isometamidium es un derivado de fenantridina, cuyo mecanismo de acción no se conoce en su totalidad, pero se cree que inhibe selectivamente la enzima topoisomerasa II del kinetoplasto [5], impidiendo así el correcto desenrollamiento de las hebras de ADN y provocando rupturas descontroladas de las mismas por aumento de la tensión. En estudios previos realizados en novillos, el clorhidrato de cloruro isometamidium demostró tener acción tanto curativa, elimi-

nando eficazmente los tripanosomas circulantes, como preventiva hasta 4 meses después de la aplicación intramuscular. Sin embargo, los autores recomiendan reservar su uso sólo para tratamientos curativos en virtud de la rapidez con que se observa la aparición de cepas de *T. congolense* y *T. vivax* resistentes al fármaco [1].

El diagnóstico de infecciones activas por tripanosomas se basa en técnicas parasitológicas de observación directa al microscopio óptico, tales como: observación de sangre fresca, técnica de microcentrifugación capilar (TMC), frotis sanguíneo de gota gruesa y frotis de capa blanca, teñidos comúnmente con solución de Giemsa al 10% o Hemacolor® [11]. Estos métodos son ampliamente utilizados bajo condiciones de campo, a pesar de su bajo porcentaje de detección del parásito [3], al requerir de una infección activa al momento de la toma de muestra. Las pruebas de diagnóstico serológico realizadas en laboratorio aportan mejor información sobre la situación del rebaño, ya que permiten detectar niveles de anticuerpos circulantes contra el parásito en el suero sanguíneo, indicativos de infección activa o reciente, como en el caso del ELISA indirecto [10, 11].

En virtud del impacto negativo que ejerce este hemoparásito sobre la producción pecuaria en Venezuela, la presente investigación fue realizada con el objetivo de evaluar la variación de la seroprevalencia de *Trypanosoma* spp., a través de ELISA indirecto, en un grupo de novillas monitoreadas trimestralmente a lo largo de nueve meses luego de la aplicación del medicamento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue llevado a cabo en un hato de cría y levante de ganado cebú, ubicado en el municipio Muñoz del estado Apure, situado aproximadamente a 15 Km al sur de la población de Bruzual, del mismo estado (7°49'03"N 69°17'31"O). La FIG. 1 muestra la ubicación relativa del hato. La zona endémica fue seleccionada por estudios previos realizados en 2006, donde Roschman-González y col. [10] determinaron una alta seroprevalencia de *Trypanosoma vivax* (74,59%). La zona se compone de una gran llanura de sabanas inundables en época de lluvia, sin relieves significativos y con variaciones climáticas menores. La temperatura oscila entre 23 y 33°C, según promedio de los registros del hato desde 2006 hasta 2010, y la altitud entre 0 y 90 msnm.

Se seleccionó el grupo comprendido por la totalidad de novillas del hato (n=513), debido a su relativamente accesible ubicación en un potrero de 1.409 ha; donde permanecieron sin rotación durante todo el estudio.

Empleando agujas 21G × 1 1/2" y tubos Vacutainer™ sin anticoagulante, las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción coccígea, en cuatro momentos durante el estudio: diciembre del 2009, marzo, junio y septiembre del 2010. Se colectaron adicionalmente muestras en tubos Vacutainer™ con anticoagulante para la realización de extendidos sanguíneos y microcentrifugación capilar (aproximadamente el 10%

de las novillas de cada muestreo). La FIG. 2 muestra los totales de animales muestreados en cada oportunidad, pues a pesar de tratarse de las mismas 513 novillas no fue posible en ninguna oportunidad recoger la totalidad del grupo del potrero. Todas las novillas fueron tratadas una semana antes de la primera toma de muestra con 1 mg de clorhidrato de cloruro de isometamidium al 2% por kilogramo de peso vivo; debido a manejo sanitario del hato no se estableció un grupo de animales control (no tratado). Las muestras de sangre se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas, se centrifugaron por espacio de 5 minutos a 5000 rpm y los sueros obtenidos se transvasaron a tubos Eppendorf® con capacidad para 1,5 mL, se trasladaron refrigerados en cava con hielo hasta el laboratorio donde se mantuvieron a -20°C en un congelador vertical (Cool-Lab™, Lab-line Instruments, Inc, Illinois, EUA) hasta la realización del ELISAI.

El antígeno fue obtenido de extracto purificado de *T. evansi*, expandido en ratas (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) de la línea Sprague Dawley, según el método descrito por Perrone [7]. Se estandarizaron las condiciones para la realización del ELISA indirecto: 1000 ng totales de antígeno por cada 100 µL (10 ng/µL), diluido en solución tampón carbonato bicarbonato 0,05M pH 9,6 (BCB). Solución de bloqueo a base de leche descremada en polvo diluida al 5% en solución tampón fosfato salino 0,2M pH 7,2 (PBS). Dilución 1:100 de cada suero problema y controles positivos y negativos en PBS y Tween 20 al 0,1%. Dilución 1:10000 del anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de bovino conjugado a peroxidasa (anti-bovine IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, EUA) y 30 minutos de exposición al cromógeno revelador 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) al 2% (ABTS, Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, EUA).

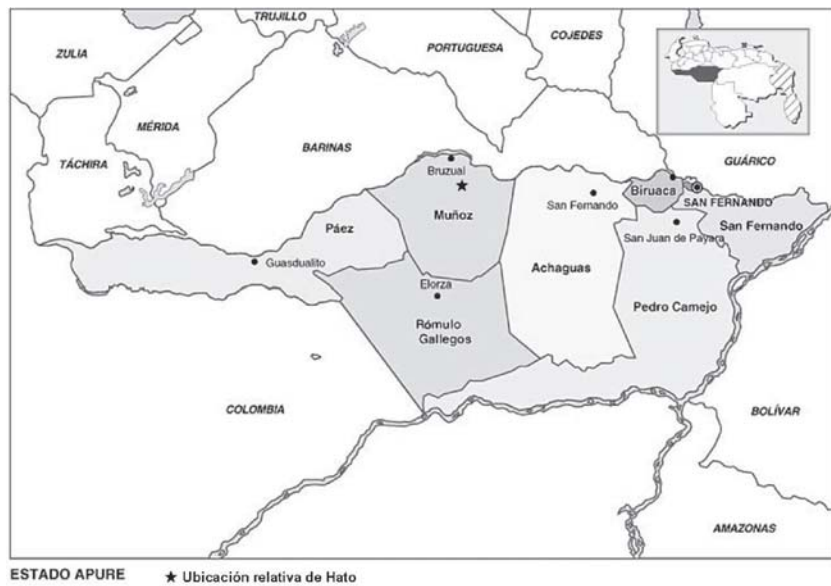


FIGURA 1. MAPA POLÍTICO DEL ESTADO APURE SEÑALANDO LA UBICACIÓN APROXIMADA DEL LUGAR DE MUESTREO.

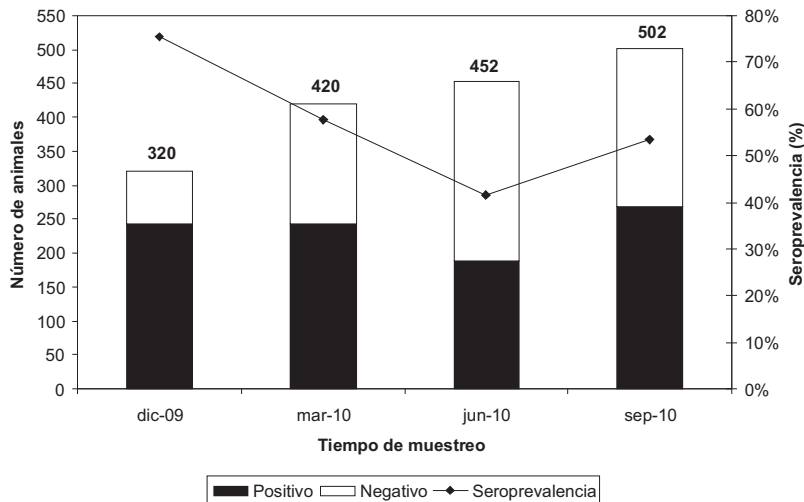


FIGURA 2. NÚMERO DE ANIMALES POSITIVOS VS. NEGATIVOS Y PORCENTAJE DE PREVALENCIA EN RELACIÓN CON LA POBLACIÓN MUESTREADA TRIMESTRALMENTE.

Como control fueron utilizados dos sueros positivos y tres sueros negativos, por duplicado en cada placa, tomados al azar de una seroteca constituida por muestras de bovinos colectadas en diversas zonas del país, probadas previamente mediante la misma técnica de ELISA y confirmadas por western blot.

Para los ensayos, 100 μ L del antígeno diluido fue agregado a cada pozo de placas de polivinilo (Immunolon® de 96 pozos, fondo U), exceptuando cuatro pozos destinados a funcionar como blancos (sin antígeno) y dos para control de la solución tampón (suero de bovino diluido 1:100 en BCB); cada placa se mantuvo en cámara húmeda por 12 h a 4°C. Se realizaron 3 lavados con solución de cloruro de sodio 1,5 M y Tween 20 al 1%. Se agregaron 200 μ L de solución de bloqueo, se incubó en cámara húmeda a 37°C durante 1 h y se descartó por inversión, sin lavar la placa. Se agregaron 100 μ L de cada suero problema diluido y de cada control, éstos últimos por duplicado, se dejaron reposar bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo y se lavaron 3 veces. Se agregaron 100 μ L del anticuerpo secundario, se incubó y lavó de igual forma. Se agregaron 100 μ L del cromógeno y se colocó la placa en agitación suave durante 30 min, a temperatura ambiente. Se realizó la lectura de la densidad óptica a una longitud de 405 nm, en un espectrofotómetro Tecan Sunrise-Basic (Grödig, Austria).

Los valores de los controles blancos obtenidos en cada placa fueron promediados y restados al resto de los valores. Los puntos de corte (PC) para determinar la positividad o negatividad de cada muestra se establecieron calculando el promedio de los tres controles negativos por duplicado más tres desviaciones estándar [10]. La prevalencia relativa se expresó en base al porcentaje ajustado de individuos positivos y negativos para cada muestreo y se analizó empleando el programa estadístico MedCalc mediante pruebas de Ji cuadrado con intervalo de confianza de 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En diciembre del 2009 fue muestreado un total de 320 animales del grupo de 513 novillas, de las cuales 242 (75,6%) mostraron seropositividad a *Trypanosoma* spp. y 78 (24,4%) fueron negativas (PC=0,184). Para marzo del 2010 se tomaron 420 muestras del mismo grupo, resultando 242 (57,6%) positivas y 178 (42,4%) negativas (PC=0,400). En junio del 2010 el total de muestras obtenidas ascendió a 452 con 188 (41,6%) positivas y 264 (58,4%) negativas (PC=0,446). Mientras que para el último muestreo, en septiembre del mismo año, se alcanzó a muestrear casi la totalidad del grupo de novillas, colectando 502 muestras, donde 268 (53,4%) fueron positivas y 234 (46,6%) negativas (FIG. 2). La disparidad observada en la población (n) de cada muestreo obedece a manejos propios del hato y condiciones climáticas particulares de cada época del año, que no permitieron recoger todos los animales en los días seleccionados

para las tomas de muestras, sin embargo los valores se ajustaron a porcentaje eliminando así las diferencias.

Al comparar, estadísticamente, los valores obtenidos mediante pruebas de Ji cuadrado, se observó diferencia significativa entre los muestreos de diciembre-2009 y marzo-2010 ($P<0,0001$), entre los muestreos de marzo-2010 y junio-2010 ($P<0,0001$), igualmente entre junio-2010 y septiembre-2010 ($P=0,0003$). Considerando que entre los últimos dos muestreos se incrementó la seroprevalencia se puede concluir que, el medicamento fue perdiendo su efectividad a medida que se alejó del momento de su aplicación. Además se pudo observar una diferencia altamente significativa (22,2%) entre el muestreo inicial de diciembre-2009 y el final realizado en septiembre-2010 ($P<0,0001$), por lo que se puede considerar beneficiosa la medida sanitaria aplicada, aunque no del todo efectiva.

En la FIG. 2 se puede apreciar, las proporciones entre animales positivos (negro) y negativos (blanco) por muestreo y el comportamiento de la seropositividad a *Trypanosoma* spp. durante el estudio, la cual mostró una disminución progresiva hasta los seis meses posteriores a la aplicación del tratamiento, para luego incrementarse nuevamente. Estos resultados coinciden con las recomendaciones de los laboratorios que elaboran la droga, que señalan una efectividad de dos a seis meses, dependiendo de la cepa de tripanosoma involucrada.

Un hallazgo de interés en este estudio fue la comprobación del alto porcentaje de bovinos seropositivos a tripanosoma en campo; aunque no se registró ningún caso clínico y/o crónico, y tampoco se logró demostrar la presencia del parásito mediante las pruebas directas que se realizaron a una proporción del grupo de novillas. Se observa entonces que estos animales desarrollan infecciones subclínicas que favorecen la permanencia del parásito en la zona. Cabe destacar que los resultados de este estudio concuerdan con investigaciones realizadas en otros Estados del país; por ejemplo, en Guárico se reporta una seroprevalencia para tripanosomosis de 60% (n=193) en tres fincas de los municipios Roscio y Ortiz [12]. Sin embargo, en infecciones naturales es común encontrar seroprevalencias diferentes entre los diversos estudios que se realizan o en un mismo estudio que abarque distintas zonas de muestreo. González y Meléndez [4] reportaron para el estado Carabobo, seroprevalencias entre 50 y 60%, para los sectores El Charal, Anca y San Pablo, mientras para los sectores Canoabito, Alpargatón y Río Abajo sólo obtuvieron valores entre 10 y 15%. Se observó entonces que la prevalencia de la enfermedad puede verse afectada por factores inherentes al Estado, dependientes de la geografía particular de la zona o, inclusive, entre hatos cercanos o vecinos, debido principalmente a manejos propios de cada sistema productivo, tales como planes sanitarios, control de vectores, etc.

A través de un estudio de dinámica estacional de vectores que se llevó simultáneamente en el hato se pudo observar

que los animales evaluados estuvieron expuestos a la picadura de moscas hematófagas de la familia Tabanidae durante todo el año. Según resultados parciales de los muestreos entomológicos mensuales realizados en la misma zona de pastoreo de este grupo de novillas, fueron colectados un total de 1.299 ejemplares entre noviembre-2009 y mayo-2010 [8]. Datos (no publicados) registrados posteriormente mostraron que la actividad de tabánidos se incrementó cerca de 86% entre junio y noviembre de 2010, colectándose un total de 7.834 ejemplares durante ese período. Esta alta densidad de vectores sugiere que pudiesen estar involucrados en la transmisión mecánica de tripanosomas en el área de estudio, tal como ha sido demostrado previamente en estudios sobre transmisión mecánica [2, 6].

A su vez, esta alta población de insectos hematófagos puede estar relacionada a factores agroecológicos que favorecen su ciclo de vida, como la abundante y cerrada vegetación presente en los bosques de galería y las amplias zonas inundables, que se mantienen anegadas inclusive varios meses después de la finalización de la temporada lluviosa.

CONCLUSIONES

El medicamento evaluado demostró ser medianamente efectivo para disminuir la prevalencia de tripanosomosis en los animales sólo durante los primeros seis meses. Sería recomendable como medida correctiva la rotación con otros principios activos para controlar la prevalencia; por ejemplo la aplicación de un fármaco del tipo diminaceno. Igualmente se recomienda continuar el monitoreo de la tripanosomosis, considerando que durante toda la investigación se observó una alta seroprevalencia contra tripanosoma ($\geq 41,6\%$).

Los resultados obtenidos representan un importante aporte al mostrar el comportamiento de infecciones por tripanosoma en bovinos, bajo condiciones naturales de explotación en Venezuela, una vez se aplica una medida sanitaria para su control.

También se observó que altos niveles de parasitemia sumados a los altos niveles poblacionales de tabánidos y otros dípteros hematófagos, podrían estar favoreciendo la transmisión mecánica del parásito. Sin embargo, se requieren estudios complementarios para determinar el papel que juegan en la epizootiología de ésta y otras enfermedades meta-zoonóticas.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación contó con el financiamiento del FONACIT a través del proyecto Misión Ciencia 2007-001425. Los autores agradecen su valiosa colaboración a la directiva y el personal de Agropecuaria Flora C.A. y Anacent C.A.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FINELLE, P.; LACOTTE, R. Action trypanocide de deux sels d'isometamidium. **Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.** 16:405-411. 1963.
- [2] FOIL, L. Tabanids as vectors of disease agents. **Parasitol. Today.** 5(3):88-96. 1989.
- [3] GARCÍA, H.; RANGEL-RIVAS, A.; CONTRERAS, I.; GARCÍA, M.E.; GARCÍA, F.; PERRONE, T. Caracterización molecular de *Trypanosoma vivax* en ovinos naturalmente infectados en dos hatos de los municipios San Fernando y Biruaca, estado Apure, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XIX (3):230-237. 2009.
- [4] GONZÁLEZ, J.R.; MELÉNDEZ, R.D. Seroprevalencia de la tripanosomosis y anaplasmosis bovina en el municipio Juan José Mora del estado Carabobo, Venezuela, mediante la técnica de ELISA. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XVII (5):449-455. 2007.
- [5] KAMINSKY, R.; SCHMID, C.; LUN, Z.R. Susceptibility of dyskinetoplastic *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum* to isometamidium chloride. **Parasitol. Res.** 83: 816-818. 1997.
- [6] KRINSKY, W.L. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). **J. Med. Entomol.** 13(3): 225-275. 1976.
- [7] PERRONE, T.M. Variación antigénica en un aislado venezolano de *Trypanosoma evansi*. Universidad Simón Bolívar. Tesis de Grado. Caracas. Venezuela. 114 pp. 1992.
- [8] RANGEL-RIVAS, A.; MIJARES, A. Fluctuación poblacional de tabánidos (Diptera: Tabanidae) en un hato de los llanos venezolanos. **7th International Congress of Dip-terology.** San José. 08/8-13. Costa Rica. 272 pp. 2010.
- [9] RIVERA, M.A. Tripanosomiasis. **Hemoparasitosis Bovinas.** CDCH-UCV. Pp. 15-84. 1996.
- [10] ROSCHMAN-GONZÁLEZ, A.; ALCÁZAR, W.; LINARES, N.; ROJAS, N.; JONES, E.; BARROETA, M.; REY, C.; CARRERO, L.; GARCÍA, V.; PERRONE, T.M. Seroprevalencia de tripanosomosis bovina en explotaciones extensivas del estado Apure, Venezuela. **LVI Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia (ASOVAC).** Universidad de Oriente, Núcleo de Cumaná. 11/ 19-24. Venezuela. 472 pp. 2006.
- [11] SOULSBY, E.J.L. Protozoa. **Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos.** Nueva Editorial Interamericana S.A. México. Pp 521-551. 1987.
- [12] TAMASOUKAS, R.; PURROY, R.; RODRÍGUEZ, H.C.; RUIZ, I.; ROA, A.N.; LABRADOR, C. Seroprevalencia de tripanosomiasis y brucelosis bovina en fincas integradas a la producción de maíz, de la zona alta de los municipios Roscio y Ortiz, estado Guárico, Venezuela. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XII (Suplemento 2):630-634. 2002.