

EFECTO DE LA INFECCIÓN CON *Trypanosoma vivax* SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE TOROS SIBONEY

Effect of *Trypanosoma vivax* Infection on Semen Quality of Siboney Bull

Hilda De Stefano¹, Beruardo González¹, Alpidio Boada-Sucre¹, Andrés Avellaneda², Susmira Godoy³ y Héctor Soto¹

¹IDECYT-CEBIV, Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Apartado 1204. Caracas, Venezuela. Fax: 6813510.

²Postgrado en Producción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.

Maracay, Edo. Aragua, Venezuela

³Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP). Maracay, Edo. Aragua, Venezuela

RESUMEN

Existen evidencias en las que toros africanos infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax* manifiestan un descenso en la calidad espermática, traduciéndose éste hecho en una posible disminución en la capacidad de fertilización. En el presente trabajo se determinan algunas de las alteraciones que causa sobre la calidad del esperma, la infección experimental con *Trypanosoma vivax* en toros tropicales tipo Siboney (5/8 *Bos taurus*, 3/8 *Bos indicus*). Para ello, un grupo de seis toros mestizos fueron tomados al azar, cuatro (4) de estos fueron inoculados con 10⁶ trypanosomas/ml; los dos (2) toros restantes permanecieron como control. Los parámetros utilizados, pre y post-infección, para la evaluación espermática fueron: motilidad individual, concentración espermática, porcentaje de atípias y viabilidad celular. Paralelamente se recopilieron datos sobre el peso corporal, circunferencia escrotal, hematocrito, parasitemia y temperatura corporal. El experimento se llevo a cabo en un período de dieciocho semanas, durante las cuales los animales infectados presentaron parasitemias recurrentes, anemia, anorexia, aletargamiento, pérdida de equilibrio, debilidad, fiebre. Además, se observó un deterioro en la calidad del semen, que se manifestó como un aumento de las atípias, disminución de la viabilidad y concentración espermática. Es probable que esto afecte la capacidad de fertilización y por ende la productividad de cualquier rebaño expuesto a este parásito, con sus implicaciones negativas en el desarrollo socioeconómico de la actividad ganadera.

Palabras clave: Tripanosomiasis, *Trypanosoma vivax*, semen, atípias espermáticas, espermatozoides, motilidad, viabilidad, bovinos.

ABSTRACT

There are evidences that African bulls infected experimentally with *Trypanosoma vivax* show lower spermatic quality, this fact can imply a possible decrease in the fertilization capacity. In the present work, we study, the effect of the experimental infection with *Trypanosoma vivax* in the quality of the semen of tropical bulls (Siboney: 3/8 *Bos taurus*, 5/8 *Bos indicus*), and some alterations of the sperm are determined. A group of six crossbred bulls was taken at random, four of them, were inoculated intravenously with 10⁶ trypanosomes/ml, and two bulls remained as control. The used parameters (obtained pre and post-infection) for the spermatic evaluation were: individual motility, spermatic concentration, percentage of atypias and cellular viability. At the same time, data were gathered on the corporal weight, scrotal circumference, hematocrit level, parasitemia and corporal temperature. The assay was carried out in a period of eighteen weeks, during which the infected animals presented recurrent parasitemias, anemia, anorexia, lethargy, balance loos, weakness and fever. Also, a deterioration was observed in the quality of the semen, which showed as an increase of the atypias, decrease of the viability and spermatic concentration. This probably affects, the fertilization capacity, and therefore, the productivity of any exposed flock to *T vivax* with negative implications in the economic development of the cattle activity.

Key words: Tripanosomiasis, *Trypanosoma vivax*, semen, spermatic atypias, spermatozoa, motility, viability, bovines

INTRODUCCIÓN

El *Trypanosoma vivax* (Kinetoplastida, *Trypanosomatidae*) es considerado uno de los agentes etiológicos de la tripa-

nosomiasis bovina a nivel mundial, el cual tiene un importante impacto económico en países tropicales [17]. En el año 1991, Otte [7] indica que en Sur América, básicamente en Colombia y Venezuela se han reportado severas epidemias ocasionadas por dicho hemoflagelado en los últimos treinta años. Es una enfermedad debilitante que se caracteriza por anemia, leucopenia, hipoglicemia, caquexia entre otros síntomas, pudiendo llegar a la muerte del animal [3, 6]. El primer reporte de tripanosomiasis en Venezuela fue realizado por Tejera [16]. A principios de la década de los noventa, Toro [18], determinó un veinte por ciento (20%) de seroprevalencia en un estudio realizado en diez estados de Venezuela. Rivera [10], señaló que la especie *T. vivax* está ampliamente distribuida en diferentes zonas ganaderas del país y recalca la necesidad de continuar y actualizar el conocimiento acerca de la presencia de este parásito en nuestro país.

Por otra parte, a pesar de que se han venido realizando numerosas investigaciones relacionadas con la tripanosomiasis bovina, no es sino hasta los últimos años cuando se ha reportado que esta enfermedad causa severos daños a nivel de la reproducción. Así, se han observado cambios a nivel de los espermatozoides, encontrándose una disminución tanto de la concentración como de la viabilidad y motilidad, además de un aumento en las anomalías morfológicas de las mismas [2, 14]. En nuestro país son escasos los trabajos relacionados con la evaluación de los efectos de ésta enfermedad sobre la capacidad reproductiva en el ganado bovino. Por tal razón, en el presente estudio se pretende determinar el efecto que tiene la tripanosomiasis sobre la calidad del semen de un grupo de toros mestizos tipo Siboney, debido a que este tipo de ganado se ha venido implementando en algunas regiones de Venezuela, por su potencial para la producción lechera y resistencia a enfermedades tropicales. Así, los resultados obtenidos podrían ser de gran utilidad para comprender los problemas a nivel reproductivo originados por la tripanosomiasis bovina en Venezuela y otras partes de Sur América.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localidad

El trabajo experimental fue realizado en las instalaciones del Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FO-NAIAP), ubicado a 452 m.s.n.m. en la ciudad de Maracay, estado Aragua, Venezuela, presenta una temperatura media de 25°C, humedad relativa de 70% y precipitación promedio de 700 mm. El mismo se llevó a cabo durante el período de sequía con una temperatura cercana a 30°C y un fotoperíodo de doce horas de luz por día.

Animales

Seis toros de edad comprendida entre 24 a 30 meses, tipo Siboney en buenas condiciones de salud fueron elegidos al azar a partir de un grupo de 16 toros que estaban sometidos

a un seguimiento de su condición física, clínica y parasitológica así como de la calidad espermática, durante el año previo al experimento.

Alimentación

Los animales fueron alimentados todos los días con una mezcla de pasto Guinea (*Panicum maximum*) y pasto Elefante enano (*Pennisetum purpureum*). La composición de la mezcla es PC: 9,40%, FC: 30,65%, EE: 2,26%, P: 0,29% y Ca: 0,56%. El agua fue proporcionada *ad libitum*.

Fase experimental

El experimento se realizó en dos etapas: un período de post-infección (10 semanas) y un período post-tratamiento (8 semanas).

Se utilizaron dos animales como control y los otros restantes se inocularon con sangre de ovino previamente infectado con *T. vivax* (aislado "Tucacas", donado por la Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias veterinarias, laboratorio de Parasitología). La concentración de parásitos inoculada fue de 10^6 trip/ml determinada con el uso de la Cámara de Naubaüer

Posterior a la inoculación, los animales se colocaron en corrales aislados para evitar la transmisión de la infección al grupo control.

El tratamiento específico a las 10 semanas consistió en una inyección intramuscular de 8 ml de cloruro de isometamidium al 2%, un tripanocida específico utilizado en el control de esta enfermedad en los bovinos

Evaluación física, clínica y parasitológica

Los parámetros monitoreados durante toda la fase experimental fueron: peso corporal, circunferencia escrotal, temperatura corporal, hematocrito y parasitemia mediante la técnica de Woo [20]. La intensidad de la infección se registró en una escala de 0 a 4 según describe París y colaboradores [8]. En la fase post-infección se realizó la evaluación tres veces por semana.

Evaluación de la calidad de semen

El semen fue colectado mediante electroeyaculación según Tegegne y col. [15]. Una vez obtenidas las muestras de semen, se procedió a analizar su calidad en base a los siguientes parámetros:

Motilidad individual: se tomó una gota de semen y se observó bajo microscopio de luz con el objetivo de 40X. Luego, se realizó una dilución 1:200 para cuantificación.

Atípicas presentes: mediante microscopía óptica y determinación de proporciones de células atípicas a través del conteo de 100 células.

Concentración espermática: número de células por ml contabilizado con la cámara de Neubaüer.

Viabilidad de los espermatozoides: determinada mediante el siguiente procedimiento: una alícuota de la muestra fue diluida 1:40 en una solución de Hepes/BSA incubada durante 10 min. a 37°C, posteriormente se diluyó 1:5 en una solución de azul de tripano al 0,2% preparada en solución isotónica a pH 7.4 y 37°C. Transcurridos cinco minutos, se colocaron 10 µl de la solución coloreada en la cámara de Neubaüer y se determinó el porcentaje de células vivas mediante la fórmula:

$$\text{Nº de células vivas} / \text{Nº de células totales} \times 100$$

Para comparar las diferencias entre los animales sanos y el grupo infectado los resultados de calidad seminal fueron analizados con un método estadístico "No paramétrico" denominado U de Mann Whitney. Para la evaluación estadística de

los parámetros clínicos se estableció un diseño completamente al azar, con análisis de varianza y pruebas de comparación de medias. Se empleó el programa estadístico Graph Pad Instat tm, versión 2,05 (1990-1994).

RESULTADOS

Clínicos

Los animales infectados presentaron parásitos en sangre periférica a partir del séptimo día y fueron recurrentes durante el período de muestreo FIG. 1. Además presentaron síntomas de anorexia, aletargamiento, pérdida de equilibrio y debilidad. El grupo control se mantuvo en buen estado de salud. En la FIG. 2, se observan los datos de peso; los mismos se mantuvieron relativamente constantes durante el proceso. De igual forma se puede observar que al cabo de diez días, la

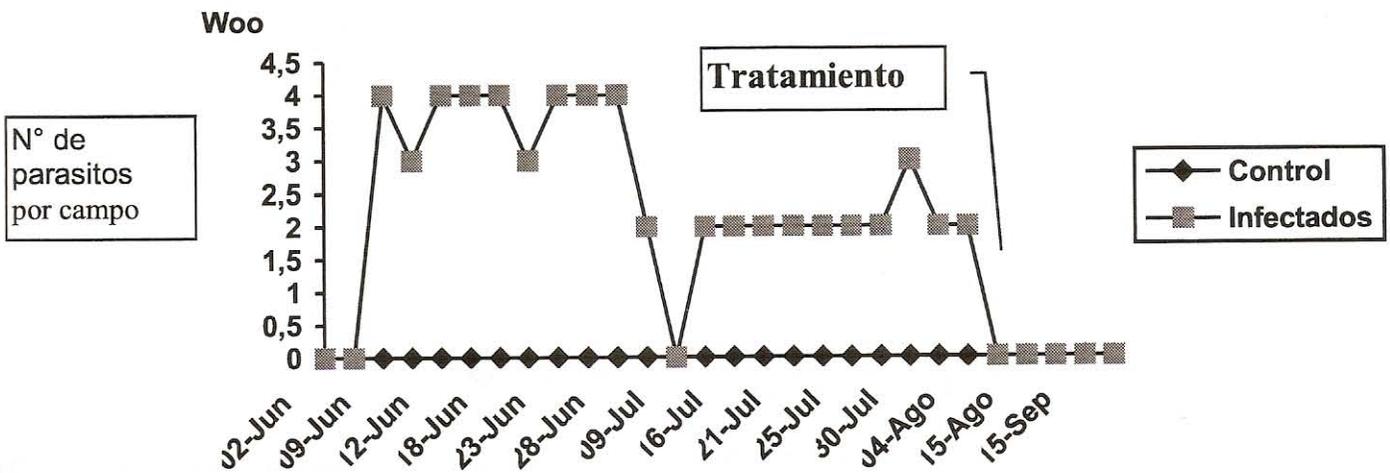


FIGURA 1. GRÁFICO DE LOS VALORES PROMEDIO DE PARASITEMIA OBTENIDOS DURANTE EL PROCESO DE POST-INFECCIÓN. LA ESCALA DE WOO (0-4) INDICA: 0=NINGÚN PARÁSITO; 1=DE 1 A 5 PARÁSITOS POR CAMPO; 2= DE 6 A 10 PARÁSITOS POR CAMPO; 3= DE 11 A 15 PARÁSITOS POR CAMPO; 4= MAYOR A 16 PARÁSITOS POR CAMPO. EL NÚMERO DE ANIMALES INFECTADOS FUE 4, SIENDO EL NÚMERO DE ANIMALES CONTROLES, 2.

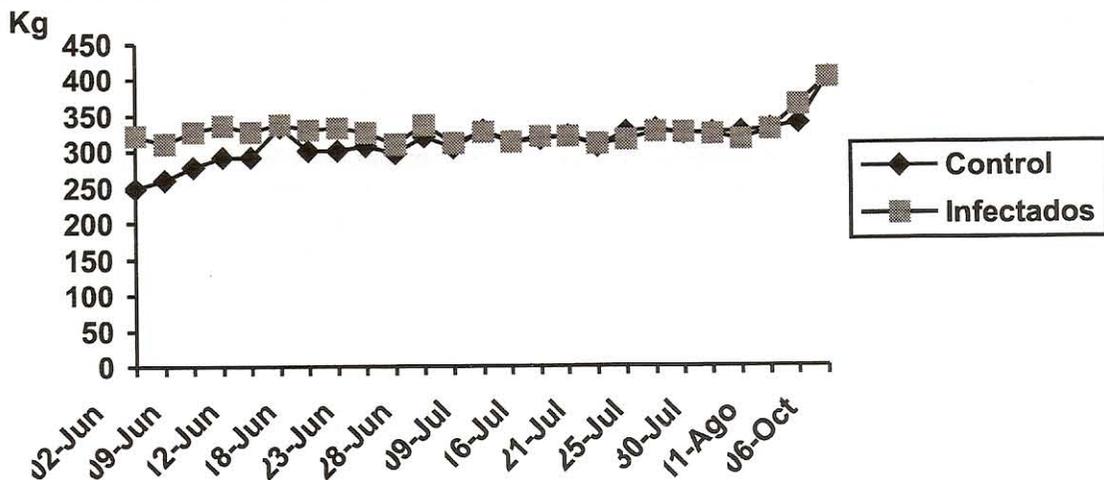


FIGURA 2. GRÁFICO DE PESO CORPORAL PROMEDIO OBTENIDO DURANTE EL PROCESO DE POST-INFECCIÓN TANTO PARA LOS ANIMALES INFECTADOS (N=4), COMO PARA LOS ANIMALES CONTROLES (N=2). (NO SIGNIFICATIVO P ≤ 0,01).

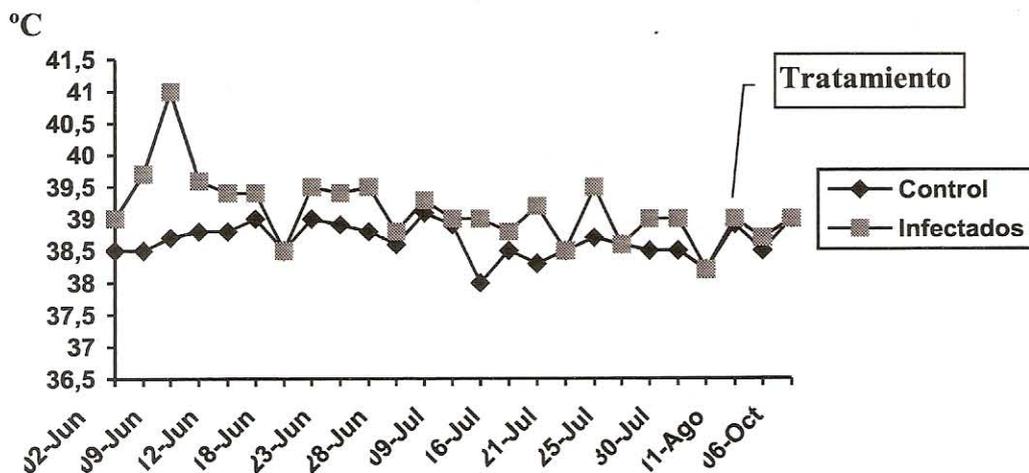


FIGURA 3. GRÁFICO DE LA TEMPERATURA CORPORAL OBTENIDO DURANTE EL PROCESO DE POST-INFECCIÓN ($P \leq 0,0001$ ALTAMENTE SIGNIFICATIVA).

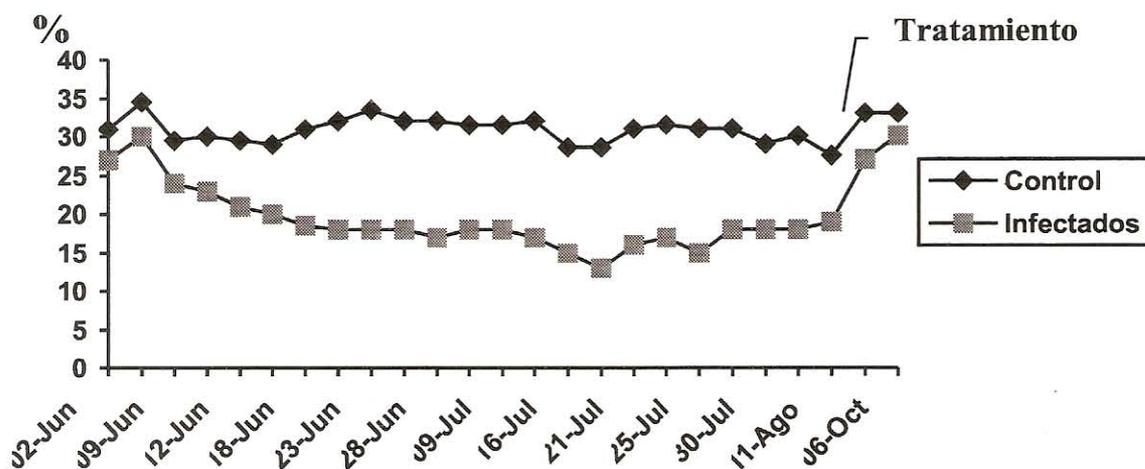


FIGURA 4. GRÁFICO DEL VOLUMEN DEL PAQUETE CELULAR (HEMATOCRITO) OBTENIDO DURANTE EL PROCESO DE POST-INFECCIÓN ($P \leq 0,0001$ ALTAMENTE SIGNIFICATIVA).

temperatura corporal incrementó, regresando a valores normales posteriormente, FIG. 3. Sin embargo, se puede evidenciar que los valores del volumen del paquete celular varían desde un 28 % hasta 17% recuperándose hasta 29% ocho (8) semanas después de haber sido tratados, FIG. 4.

Calidad de semen

Los animales utilizados en el experimento presentaban buenas características en lo que se refiere a la calidad del semen. Durante el período de infección, la concentración espermática presentó ciertas variaciones tanto para el grupo control como para el infectado (datos no mostrados), atribuidas éstas al método empleado para obtener la muestra, debido a que en algunos casos no había una eyaculación completa, obteniéndose una fracción sumamente diluida, modificándose así los verdaderos valores de concentración. Con respecto a la viabilidad y la motilidad individual se observó que ambos valores disminuyeron significativamente y que posterior al tratamiento vuelven a presentar valores cercanos al del grupo control. Analizando el porcentaje de atípicas general se encontró que

las mismas aumentaron con la infección y nuevamente al final del experimento muestran valores parecidos al control. Por último, con respecto a la circunferencia escrotal no se observó ningún cambio significativo, TABLA I.

Tratamiento

En la TABLA II se muestran los datos obtenidos de los porcentajes de atípicas clasificadas por tipo. De la misma se desprende que los tipos de anomalías morfológicas que aumentaron en mayor proporción son cola doblada y cola enrollada, también se presentó un incremento del porcentaje en células que carecían de cola, en cambio, la presencia de gota citoplasmática y la inserción anormal mostraron valores muy parecidos al control.

DISCUSIÓN

Según los datos obtenidos se puede evidenciar que el período de incubación de los parásitos para éste caso fue de siete (7) días y posterior a los mismos, los animales mostraron

TABLA I
VALORES (MEDIA ARITMÉTICA) OBTENIDOS POSTERIOR A LA INOCULACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DEL GRUPO CONTROL (ENTRE PARÉNTESIS) Y DEL INFECTADO.

Semana Post inf.	Viabilidad (*) (%)	Motilidad ind.(**) (%)	Atipias(***) (%)	Circunferencia escrotal
2	27 (83)	21 (70)	49 (17)	34 (33)
4	20 (84)	13 (70)	41 (25)	31 (32,5)
6	31 (75)	23 (65)	35 (25)	30,5 (32)
8	53 (65)	13 (60)	33 (22)	30,5 (31,75)
10*	71 (92)	8 (75)	19 (12)	30,5 (31)
19	63 (77)	62 (60)	25 (19)	32 (29,5)

Las diferencias significativas entre el grupo control e infectados están denotadas por uno, dos o tres asteriscos: *P< 0,004; **P< 0,009; ***P< 0,03.

TABLA II
VALORES (MEDIA ARITMÉTICA) DE LAS DIFERENTES ATIPIAS MORFOLÓGICAS OBTENIDAS POSTERIOR A LA INFECCIÓN, EXPRESADOS EN PORCENTAJE (%), PARA EL GRUPO INFECTADO Y EL CONTROL (ENTRE PARÉNTESIS)

Semana p.i.	Cola enrollada (*)	Cola doblada(**)	Sin cola (**)	Inserción anormal	Gota citoplasmática
0	3 (2)	8 (4)	1 (1)	- (-)	2 (1)
2	11 (4)	21 (12)	11 (2)	1 (-)	2 (2)
4	9 (4)	18 (5)	8 (1)	1 (-)	1 (1)
8	16 (2)	8 (5)	24 (2)	1 (-)	1 (1)
10	9 (3)	14 (10)	9 (3)	- (-)	- (-)
19	6 (6)	15 (9)	2 (-)	- (-)	2 (-)

Las diferencias significativas entre el grupo control e infectados están denotadas por uno o dos asteriscos: *P< 0,03; **P< 0,06.

signos de debilidad, pérdida de equilibrio, anorexia, cuadro febril, entre otras, además, se observó una considerable disminución del volumen del paquete celular de los animales infectados, resultados que indican que los mismos desarrollaron la enfermedad [6].

Los resultados en la evaluación de la calidad seminal mediante diversos parámetros en animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma vivax*, demuestran un efecto negativo sobre la misma. Así, animales que presenten una baja calidad seminal como la observada en éste trabajo, eventualmente presentarán serios problemas de fertilización. Resultados similares fueron obtenidos por otros investigadores en ovinos y caprinos [2, 5, 12, 13]. El deterioro progresivo de la calidad del semen puede ser atribuido a daños a nivel de los genitales, reflejados en perturbaciones fisiológicas y/o endocrinas, ya que existen evidencias que la concentración de testosterona en sangre disminuye progresivamente en caprinos infectados con *T. congolense* [19] al igual que ovinos y caprinos infectados con *T. congolense* y *T. brucei* [1]. El descenso de dicha hormona probablemente afecte tanto la espermatogénesis como la síntesis de sustancias (glucosa, fructosa, citrato) indispensables para la motilidad, mantenimiento del pH y osmolaridad. Por otra parte, Anosa [3] reporta que la tripanosomiasis causa alteraciones metabólicas, tales como hipoglicemia. Pino [9] indica que la hipoglicemia puede ser causada por desequilibrios en los mecanismos

hepáticos o endocrinos, más que por el consumo de glucosa por parte del parásito. Sin embargo, el hecho de que la concentración de glucosa en la sangre disminuya, podría afectar la transformación de ésta en fructosa, proceso que ocurre en las vesículas seminales [4], produciéndose así un líquido seminal pobre en fructosa la cual es la principal fuente de energía a utilizar por los espermatozoides, y a su vez afectar sobre la motilidad y viabilidad de los mismos.

Sin embargo, es importante resaltar que los animales infectados mostraron una notable mejoría posterior al tratamiento, deduciéndose que los daños causados no fueron irreversibles, posiblemente debido a la baja patogenicidad de la cepa con la cual se trabajó o a la resistencia de los hospedadores. Estos resultados no coinciden con los reportados por otros autores [11], quienes señalan que toros Cebú infectados con *T. vivax* y *T. congolense* y tratados a las doce semanas post-infección (estado crónico) con novidium, a pesar de no presentar parásitos en sangre periférica, no mostraron mejoría en lo que respecta a los daños histopatológicos al nivel de los testículos y del epidídimo, sino hasta diez y ocho semanas posterior al tratamiento. Se requiere llevar a cabo experimentos que contemplen períodos de ensayo más largos a objeto de evaluar el efecto de la infección crónica de toros, y sus posibles efectos sobre la eficiencia reproductiva de los rebaños expuestos a esos sementales en estas condiciones.

A pesar de que en este caso los daños causados no parecen haber sido irreversibles, si se presentó una baja calidad de semen durante la fase aguda de la enfermedad, de tal forma que al menos durante un período de tiempo considerable (dos meses consecutivos) la eficiencia reproductiva del rebaño puede verse comprometida en presencia de la enfermedad, reflejándose desde un punto de vista económico, en pérdidas significativas para la explotación.

Por último, es preciso señalar la importancia de realizar estudios complementarios sobre el efecto de la tripanosomiasis en el ganado bovino, tales como, metabolismo de las células espermáticas, concentración de hormonas, histopatología del testículo, ultraestructura de las células espermáticas, entre otras, de tal forma que sea posible con una mayor amplitud, determinar a que nivel se están dando los cambios debidos a la enfermedad.

CONCLUSIONES

La infección de toros con *T. vivax* produjo signos clínicos y resultados de laboratorio que confirmaron el desarrollo de tripanosomiasis en estos animales y alteró la calidad de semen por un período de ocho semanas, la cual fue restablecida posterior al tratamiento con el tripanocida específico.

Las alteraciones espermáticas más evidentes estuvieron asociadas a la viabilidad y motilidad celular así como a la presencia de atípicas.

En condiciones de campo, toros infectados con *T. vivax* pueden ver afectada su calidad seminal y su fertilidad, y por lo tanto, su capacidad de servir vacas de forma eficiente.

RECOMENDACIONES

Es necesario profundizar en este tipo de investigaciones incorporando estudios metabólicos de las células espermáticas, concentración de hormonas, histopatología del tejido testicular, ultraestructura, etc., con el fin de precisar el nivel de los daños que estos parásitos causan a la función reproductiva de toros explotados en condiciones tropicales.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT.) por el financiamiento a través de su programa de Fortalecimiento, Proyecto N° F-96001279 y al Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP), Maracay. Igualmente el personal del laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ADEYEMO, A.; OYEJIDE, A.; AGBEDANA, O. Plasma testosterone in *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma brucei* infected West African Dwarf Rams. **A. Rep. Sci.** 22: 21-26. 1990.
- [2] AGU, W.E.; IGE, K.; OLATUNDE, D.S. Evaluation of Semen Quality of Rams Infected with *Trypanosoma vivax*. **A. Rep. Sci.** 11: 123-127. 1986.
- [3] ANOSA, V.O. Haematological and biochemical changes in human and animal trypanosomiasis. Part I. **Revue. Elev. Méd. Vét. Pays. Trop.** 41 (1): 65-78. 1988
- [4] DEVLIN, T. **Biochemistry with Clinical Correlations.** Second Edition. John Wiley & Son. New York. 1016 pp. 1987.
- [5] ISOUN, T.T.; ANOSA, V.O. Lesion in the reproductive organs of sheep and goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. **Z. Tropenmed. Parasit.** 25: 469-476. 1974.
- [6] MAXIE, M.; LOSOS, G.; TABEL, H. Experimental bovine trypanosomiasis (*T. vivax* y *T. congolense*). 1st Symptomatology and clinical pathology. **Tropenmed. Parasitol.** 30: 274-282. 1979.
- [7] OTTE, M. La importancia de la tripanosomiasis en la industria ganadera de Córdoba. Colombia. Proyecto ICA. (GT2 Bogotá). Mimeo. 151 pp. 1991.
- [8] PARÍS, J.; MURRAY, M.; MCODEMBA, F. A comparative evaluation of parasitological techniques currently available for diagnosis of african trypanosomiasis. **Acta Trop.** 39 (4): 307-316. 1982.
- [9] PINO, D. Recientes avances en la patogenicidad del *Trypanosoma*. LUZ. Fac. Cs. Vets. Mimeo. 24 pp. 1984.
- [10] RIVERA, M.A. **Hemoparasitosis Bovinas.** Anauco Ediciones. Primera Edición Caracas, Venezuela 243 pp. 1996.
- [11] SEKONI, V.O. Effect of novidium (homidium chloride) chemotherapy on genital lesions induced by *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* infection in zebu bulls. **Br. Vet. J.** 146 (2): 181-185. 1990.
- [12] SEKONI, V.O. The Effect of *Trypanosoma vivax* and *T. congolense* on the Reaction Time and Semen Characteristics in the Zebu Bull. **Br. Vet. J.** 148: 501-506. 1992.
- [13] SEKONI, V.O. Elevated sperm morphological abnormalities of Yankasa rams consequent to *T. vivax* infection. **A. Rep. Sci.** Vol. 31(3,4): 243-248. 1993.
- [14] SEKONI, V.O. Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: a review. **Theriogenology.** Vol. 42: 557-570. 1994.

- [15] TEGEGNE, A.; DEMBARGA, Y.; KASSA, T.; FRANCESCHINI, R. Effect of plane nutrition and season on body and testicular growth and on semen characteristics in Boran and Boran x Fresian bulls in Ethiopia. **A. Rep. Sci.** Vol. 36: 197-209. 1994.
- [16] TEJERA, E. Tripanosomiasis animal en Venezuela. **Bull. Soc. Path. Exot.** 13: 297-305. 1920.
- [17] TAMASUKAS, L.R.; ROA, N.A Trypanosomiasis bovina (*T. vivax*): Una revisión. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay. 64 pp. 1996.
- [18] TORO, M. Seroepidemiología de las hemoparasitosis en Venezuela. Memorias Curso sobre técnicas de Inmuno-diagnóstico de Enfermedades causadas por Hemoparásitos. USB-UCV. Mimeo. 12 pp. 1990.
- [19] WAINDI, E.N.; GOMBE, S.; ODUR-OKELO, D. Plasma Testosterone in *Trypanosoma congolense* infected Toggerburg goats. **Archives of Andrology.** 17: 187-189. 1986.
- [20] WOO, P.T.K. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Can. J. Zool.** Vol. 47: 921-923. 1969.