



Infección por *Trypanosoma spp.* en ovinos sintomáticos en el Municipio de León, Nicaragua

Brenda del Socorro Mora Sanchez, MSc
Escuela de Medicina Veterinaria
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.
E-mail: bremsa2006@yahoo.es
Celular: 505-84257062

Kenia Abigail Castro Rodríguez, MSc.
Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.
E-mail: keniaabigail@yahoo.es
Celular: 505-86077700

Recibido: 27/02/2015

Aceptado: 05/05/2015

RESUMEN

La tripanosomiasis es una enfermedad debilitante y comúnmente fatal en los animales domésticos, especialmente en bovinos y pequeños rumiantes. Es ocasionada por varias especies de *Trypanosomas*, principalmente *Trypanosoma vivax*. Este estudio tiene por objetivo describir la prevalencia de *Trypanosoma* en ovinos sintomáticos en una finca del municipio de León, Nicaragua. Se analizaron un total de 100 ovinos pelibuey con sintomatología con la técnica de tinción de giemsa e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se identificó la presencia de *Trypanosomas* en el 47% en la tinción de Giemsa y un 85% de anticuerpos anti-*Trypanosomas* mediante la técnica IFI. Las hembras resultaron más afectadas que los machos. La característica clínica más relevante que presentaron los pelibuey fue la debilidad. Se recomienda realizar estudios aleatorios en diferentes zonas y épocas del año con el fin de establecer curvas de endemidad.

Palabras claves: *Trypanosoma*, ovinos, tripanosomiasis, inmunofluorescencia indirecta, pelibuey.





1- INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis es ocasionada por varias especies de *Trypanosomas*, de los cuales el *Trypanosoma vivax* es considerado como el agente causal de mayor importancia en rumiantes domésticos y silvestres en Sur América, donde ha sido mayormente estudiada. Los pequeños rumiantes pueden ser importantes reservorios de la infección, a partir de los cuales puede pasar al ganado vacuno. La tripanosomiasis en los ovinos puede generar costos médicos y económicos^[1].

Oliveira en el 2007 reportó por primera vez en Costa Rica la prevalencia de *T. vivax* con un 32.1% en el ganado bovino^[2]. El género *Trypanosoma* no se ha estimado como un agente nosológico importante en pequeños rumiantes domésticos aun cuando estudios epidemiológicos en Venezuela, señalan seroprevalencia variables para *T. vivax*, que oscilan desde 9.75% hasta 62.3%.^[3, 4]

En un primer reporte realizado por Tenorio en la escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua se identificó un 37% de *Trypanosoma spp*, en muestras de sangre de rebaños de ovejas con la técnica de tinción de Giemsa, aunque es una prueba de baja sensibilidad, se obtuvo un 37% de resultado positivo.^[5]

En Nicaragua no se han publicado estudios que describan la prevalencia de infección por *Trypanosoma* en rumiantes, como ganado vacuno, ovino y caprino. Sin embargo de manera accidental se han detectado casos de frotis positivos en sangre de ovinos.^[5]

En la actualidad la crianza de ovinos en nuestro país ha cobrado importancia económica y comercial, razón por lo que esta investigación pretende conocer la prevalencia de infección de *Trypanosoma* en ovinos sintomáticos, proporcionando una base para el diagnóstico y control de la tripanosomiasis en esta especie.

2- DISEÑO METODOLÓGICO

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en la ciudad de León, Nicaragua. Se tomaron un total de 100 muestras de sangre pertenecientes a ovinos pelibuey que presentaron signos de emaciación, ubicados en la finca Km 8 carretera a PoneLOYA del Departamento de León, Nicaragua durante el período de marzo – septiembre 2012.

Procedimiento de recolección de la información:

Se llenó un cuestionario que constaba de datos generales y específicos de cada animal. Con el consentimiento de los dueños de pelibuey, las muestras de sangre se recolectaron utilizando EDTA (1 mg/ml sangre); y fueron transportadas al laboratorio del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN, León) de la ciudad de León, para ser analizadas con las técnicas: tinción con Giemsa de extendido periférico, hematocrito y la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

Identificación de los trypanosomas:

- Tinción de Giemsa:

Se colocó 20 µl en el extremo de un portaobjeto limpio y se preparó una extensión fina. La extensión se dejó secar y se fijó por dos minutos con alcohol metílico. Luego se tiñó por 25 minutos con Giemsa. Se observó la lámina con un lente de 100x en busca de parásitos con las características del tripomastigote sanguíneo.



- **Obtención del antígeno**

A cinco pelibuey infectados con *Trypanosoma* confirmados por extendido periférico, se le extrajeron 50 ml de sangre con EDTA. Con el objetivo de separar los parásitos de la sangre, se centrifugó la muestra y se extrajo la capa de glóbulos blancos; estos se lavaron cuatro veces con solución de PBS (pH 7.2) por 10 minutos a 3000 rpm. Se realizó una dilución 1:5 del antígeno purificado y se fijó 10 μ l de este en las láminas portaobjetos. Estas se almacenaron a -20°C para su uso posterior. Este procedimiento fue descrito por Wood Ronger, Kuanz.^[6]

- **Detección de anticuerpos IgG**

La detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma* se realizó con la técnica de IFI. Para esto, se colocó 10 μ l de suero de pelibuey diluidos (1/4, 1/6 y 1/8) en una lámina con antígeno fijado. Se incubó por 60 minutos a 37°C en cámara húmeda. Luego se lavó la lámina tres veces por cinco minutos con PBS (pH 7.2). Se añadió 10 μ l de un conjugado compuesto de: anti-IgG anti-cabra (diluido: 1/128) y azul de Evans (diluido 1/20) como colorante contraste. Se dejó incubar por 60 minutos a 37°C en cámara húmeda; luego se repitieron las lavadas por 5 minutos cada vez y se colocó una gota de glicerina bufferada para proceder a buscar fluorescencia verde en microscopio de fluorescencia.

- **Control de calidad**

Para descartar reacciones cruzadas se seleccionaron sueros de referencias entregados por el MAGFOR central al laboratorio de CEVEDI (Centro Veterinario de Diagnostico e Investigación) de Medicina Veterinaria de la UNAN, León: 10 sueros positivos para Babesia, 10 positivos para Anaplasmosis, 10 positivos para *Leptospiriosis* y 10 sueros de humanos negativos para *Trypanosoma cruzi*. Con estos controles se determinó como título umbral la dilución $\frac{1}{4}$.

- **Determinación del Hematocrito**

Se llenó las $\frac{3}{4}$ partes de un capilar con sangre con EDTA; se selló con plastilina y se centrifugó a 3.000 rpm. durante 5 minutos, se lee el capilar confrontándolo con la tabla lectora.^[7] Se consideró anémicos a los que tuvieron un hematocrito inferior al 40%.

- **Evaluación de la condición corporal**

Se evaluó en base a estándares internacionales establecidos para el ovino. Los animales se clasificaron desde desnutridos (“flacos, y/o con caquexia”), hasta sobre-alimentados (“gordos, obesos”). Esto indica el balance del animal entre entrada, (consumo, digestión y metabolismo) y salida de nutrientes, (crecimiento, gestación, producción, enfermedad). Las medidas corporales que se realizaron fueron: ancho, largo y profundidad de la cabeza; ancho, largo y profundidad del tórax; ancho anterior, ancho posterior y largo de la grupa; altura de la cruz, largo del cuerpo y perímetro torácico, abdominal y de la caña. Otra forma es colocándolos en una balanza y considerándose un peso óptimo del animal entre 30 – 40 kilogramos. Además se evaluó algunos signos clínicos como temperatura (normal 39°C) y diarrea (más de tres evacuaciones diarias).

- **Plan de análisis de los datos**

Los datos fueron analizados mediante el programa estadísticos SPSS versión 15.0. Se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas, promedios y desviación estándar. Las variables se asociaron con la prueba de chi-cuadrado, tomando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo. Los datos se agruparon en tablas y gráficos.



3- RESULTADOS

Las observaciones microscópica de los frotis sanguíneos de los animales infectados permitió reconocer y observar las características morfométricas de los *Trypanosomas* observados: extremo posterior romo o redondeado, kinetoplasto grande, membrana ondulante poco desarrollada, flagelo corto; y medidas de longitud que variaban de 30µm a 39 µm, lo que corroboró que el hemoparásito observado corresponde a una especie de *Trypanosoma spp.*

Por medio del frotis teñido con Giemsa se obtuvo una prevalencia del 47% de pelibuey infectados con *Trypanosomas spp.* Sin embargo, con la técnica de IFI se obtuvo un 85% de seroprevalencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma*. (Gráfico 1 y 2)

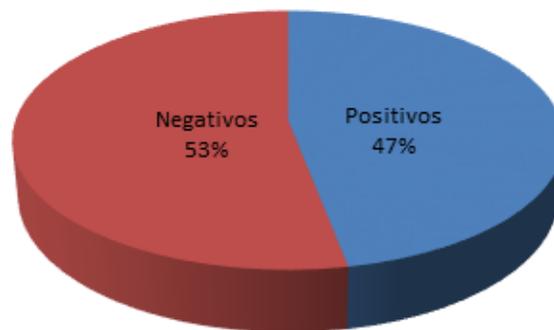


Gráfico 1: Prevalencia de *Trypanosoma spp* en los frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa.

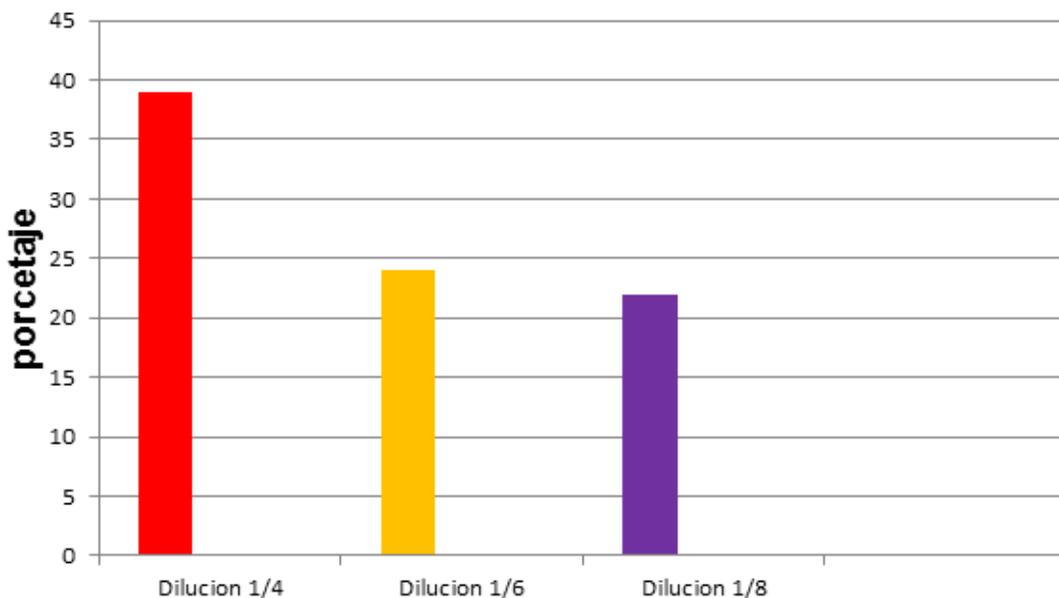


Gráfico 2: Ovinos Positivos a Inmunofluorescencia Indirecta y dilución.



Al comparar los resultados de la tinción de Giemsa con los resultados de IFI según el sexo, se encontró que el 49% de las hembras resultaron positivas a tripanosomiasis, y en los machos solo el 30%, con una $p=0,256$. Con la técnica de IFI se encontró que el 91% de las hembras resultaron positivas mientras que en los machos solo el 30% mostrando una relación estadísticamente significativa ($p<0.001$). (Tabla 1)

Tabla 1. Frecuencia de ovinos positivos a tripanosomiasis por IFI y tinción de Giemsa, según:

sexo	Muestras (n)	Sexo			
		Animales positivos			
		Tinción Giemsa ($p= 0.256$)		IFI ($p< 0.001$)	
		n	%	n	%
Machos	10	3	30	3	30
Hembras	90	44	49	82	91
Total	100	47	--	85	--

Al analizar el hematocrito de los pelibuey, se observó que los que resultaron positivos con tinción de Giemsa tenían un promedio de hematocrito del 22% (DE=8.9) y los que resultaron negativos un 18% (DE=5.3). (Tabla 2)

Tabla 2: Promedio y Desviación estándar del Hematocrito en muestras con presencia y ausencia de *Trypanosoma spp*

HEMATOCRITO		
	Presencia de <i>Trypanosoma spp</i> en la Tinción	Ausencia de <i>Trypanosoma spp</i> en la Tinción
PROMEDIO	22%	18%
DE_±	8.9	5.3

± Desviación Estandar

En la evaluación de la condición corporal, los pelibuey positivos tanto a la tinción con Giemsa como a la técnica de IFI presentaron hipotermia en un 19% ($p=0.002$) y 32% ($p=0.014$) respectivamente. La debilidad y la desnutrición fueron signos con alta frecuencia en los pelibuey seropositivos con un 88% ($p<0.001$) y 45% respectivamente. (Tabla 3)





Tabla 3. Evolución de la condición corporal y signos clínicos de los ovinos (pelibuey) positivos a tripanosomiasis

Parámetros	TINCION GIEMSA			IFI		
	Positivos (%) n=47	IC (95%)	Valor de <i>p</i>	Positivos (%) n=85	IC (95%)	Valor de <i>p</i>
Temperatura						
• Hipotermia ($T^{\circ} < 37^{\circ}C$)	9 (19)	0.10 – 0.65	0.002	27 (32)	0.07 – 0.72	0.014
• Fiebre ($T^{\circ} \geq 39^{\circ}C$)	14 (30)	0.59 – 3.55	0.279	22 (26)	0.27 – 3.32	0.586
Pérdida del apetito	16 (34)	0.51 – 2.76	0.421	25 (29)	0.15 – 1.45	0.153
Debilidad	41 (87)	0.94 – 7.66	0.474	75 (88)	5.50 – 77.2	
Diarrea	2 (4)	0.09 – 3.11	0.397	3 (4)	0.02 - 0.81	0.042
Grado de nutrición*						
• Nutrido	8 (17)	0.23 – 1.69	0.2511	20 (24)	0.53 – 34.8	0.124
• Sobre- nutrido	20 (43)	1.06 – 6.01	0.0275	26 (31)	0.21 – 2.04	0.330
• Desnutrido	19 (40)	0.27 – 1.34	0.1492	39 (45)	0.24 – 2.22	0.399



4- DISCUSIÓN

En Nicaragua no se ha reportado estudios que permitan conocer la prevalencia de infecciones de *Trypanosomas spp* en pelibuey. El estudio microscópico de los frotis sanguíneos coloreados reveló la presencia de *Trypanosoma spp*, en base a las características morfológicas que la literatura refiere.^[8, 9] Según un estudio realizado por Hoare en Lima Perú, el rango de largo del *Trypanosoma vivax* es de 32µm a 39µm, (incluyendo el flagelo libre).^[10] El estudio microscópico de los frotis sanguíneos teñidos con colorante de Giemsa, permitió la identificación morfológica en 47% de las muestras estudiadas para *Trypanosoma spp*. Un estudio en ovinos realizado por primera vez en Costa Rica por Oliveira y cols. en el 2007 mostró una prevalencia semejante a la encontrada en el presente estudio (49.1%), en el que se utilizó los mismos criterios para la identificación y clasificación de los parásitos.^[2] Sin embargo debe tomarse en cuenta que el frotis de extendido periférico tiene baja sensibilidad.

La técnica de IFI mostró una prevalencia del 85% de Anticuerpos anti-*Trypanosoma*. Este dato es comparable a un estudio realizado por Roa en Venezuela en donde se reportan seroprevalencias variables de anticuerpo anti-*Trypanosoma* en rebaño de ovinos y caprinos para *T. vivax* que oscilan entre el 75.7% al 82.3%³. En otro estudio realizado por González y cols. en el 2007, se obtuvo una seroprevalencia de 84.5% en ovinos del estado de Carabobo de Venezuela¹¹. Así mismo, otro estudio realizado por Duno y cols., en la región nororiental del estado Falcón Venezuela diagnosticó el parásito por tinción de Giemsa solamente en 1% de los ovinos, mientras que 57.8% presentaron anticuerpos anti-*T. vivax*. Similarmente, Guillén y cols., en el 2001 encontraron un 87% de prevalencia a *T. vivax* en ovinos de los llanos Venezolanos.^[12, 13]

Al relacionar el sexo de los pelibuey y la presencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma* se encontró que el 91% y 30% de las hembras y los machos resultaron positivos respectivamente, con una relación estadísticamente significativa. Estos resultados son semejantes a los hallazgos encontrados por Sandoval y cols., en el valle de Aroa y los encontrados por Duno y cols., quienes señalan que en las tasas de infección se presentaron diferencias entre machos y hembras siendo estas quienes presentan mayor infección.^[12, 14] Otro estudio realizado por Suarez y cols., en cuatro hatos ganaderos distribuidos en cuatro llanos orientales y occidentales de Venezuela, demostró que el sexo no era un factor de riesgo asociado a la *Trypanosomiasis* sin embargo, las hembras presentaban mayor porcentaje de infección.^[15]

Con respecto al hematocrito en los ovinos muestreados, se encontró que el promedio del hematocrito fue mayor en los ovinos con presencia de parásitos (22%), lo cual no fue estadísticamente significativo ($p=0.279$). Se definió como animales anémicos aquellos que presentaron un valor del hematocrito inferior a 40%. Estas observaciones son similares a los informados en otras investigaciones sobre *Trypanosomiasis* en rumiantes causada por el *T. vivax*.^[16-18] Suárez y cols., realizaron un estudio experimental cuyo objetivo fue determinar el comportamiento parasitológico y hematológico en pelibuey infectados con *Trypanosoma vivax*, y demostraron que el 86% (43/50) con *Trypanosomas* presentaban valores bajos de Hematocrito (16 a 23%).^[19]

En este estudio, el signo clínico cardinal observado en los ovinos positivos fue la debilidad seguido por la desnutrición e hipotermia, lo cual también ha sido reportado en otros estudios.^[3, 20-22] En un estudio realizado por Pellin y cols., en Venezuela los signos clínicos fueron más evidentes en el segundo mes de la infección, período en el cual los animales presentaron una condición física deteriorada, con desnutrición que los llevaba a una debilidad presentando elevadas parasitemia antes de la muerte.^[23] Un comportamiento patogénico similar fue observado por Sandoval en ovinos y caprinos infectados experimentalmente con cepas aisladas venezolanas de *T. vivax*.^[24] Sin embargo, Shaw y Lainson afirman que en Sur América la enfermedad ocasionada por el *T. vivax* en los rumiantes es predominantemente crónica, con manifestaciones clínicas referidas a emaciación progresiva, anemia, aumento variable de nódulos linfáticos, con muerte observadas solo ocasionalmente.^[25]



5- CONCLUSIONES

Se identificó la presencia de *T. vivax* en el 47% de las muestras de sangre de ovinos enfermos mediante la técnica de tinción de Giemsa y un 85% de anticuerpos anti-*Trypanosomas* detectados mediante la técnica IFI. Las hembras resultaron más afectadas que los machos según las dos técnicas aplicadas; La característica clínica más relevante que presentaron los pelibuey estudiados fue la debilidad.

AGRADECIMIENTOS

- Cooperación Sueca. Patrocinadores del estudio.
- Rosario Palma, MSc. Tutora.
- Fernando Salazar, PhD.
- Yahoska Reyes, MSc.
- Samuel Vilchez, PhD. Jefe del Dpto. de Microbiología y Parasitología.
- Filemón Bucardo, PhD.
- Dr. Willian Jirón Director de la Escuela de Medicina Veterinaria,
- Al personal de Biopatología de la Escuela de Medicina Veterinaria y al CEVEDI.
- Dra. Cristiane Duttmann.
- Byron Flores Msc.
- Sra. Cándida Hernández, Sra. Antonia Obando, Sra. Yanet Reyes y Sr. Edwin Herrera.
- Mis primeros maestros: Aleyda Téllez, PhD y Byron Leiva, PhD
- A todos los trabajadores del Departamento de Microbiología y Parasitología.
- Este trabajo se realizó gracias a la colaboración de Dpto. Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNAN, León y el apoyo de la Escuela de Medicina Veterinaria.





6- REFERENCIAS

- Davila AM, Silva RA. Animal Trypanosomiasis in South America: Current status, partnership, and information technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;916(1):199-212.
- Oliveira JB, Hernández-Gamboa J, Jiménez-Alfaro C, Zeledón-Araya R, Blandón-Naranjo M, Urbina-Villalobos A. First report of *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle from Costa Rica. Primer informe de infección de *Trypanosoma vivax* en ganado lechero de Costa Rica. *Veterinary Parasitology*. 2009;163(1/2):136-9.
- Roa N. CF., R. Ordoñez, L. Soler, A. Rivas, R. Tamasaukas, H. Ruiz, M. Cobo y A. Aguirre. Relación entre la prevalencia del *Trypanosoma vivax* y la respuesta reproductiva en hembras gestantes en un rebaño cerrado de ovinos en Aragua, Venezuela. I Simposium Nacional Hemoparásitos y sus Vectores Maracay Venezuela. 1998:64 p.
- Tamasaukas R, ROA N, ASO P, Ruiz H, Aguirre A, ORDÓÑEZ LSYR. Diagnóstico por QBC e IFI de *Trypanosoma vivax* en ovinos estabulados en un rebaño cerrado del estado Aragua, Venezuela. I Simposium Nacional Hemoparásitos y sus Vectores Maracay Venezuela. 1998.
- Tenorio I. Primer reporte de *Trypanosoma* en León, Nicaragua. 2010.
- Woo P, Rogers D. A statistical study of the sensitivity of the haematocrit centrifuge technique in the detection of trypanosomes in blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1974;68(4):319-26.
- Reyna-Bello, A.; García, F.A.; Rivera, M.; Sanso, B.; Aso, P.M. 2008. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Vet. Parasitol.*,80:149-157.
- Soulsby EJJ. *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos* 1987.823p.
- Dwinger R, Hall M. Trypanosomosis due to *Trypanosoma vivax* in ruminants in Latin America. *Animal Trypanosomosis: Diagnosis and Epidemiology*. 2000:50-5.
- Hoare CA. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. The trypanosomes of mammals A zoological monograph. 1972.
- González JR, Meléndez RD. Seroprevalencia de la Tripanosomosis y Anaplasmosis Bovina en el Municipio Juan José Mora del Estado Carabobo, Venezuela, Mediante la Técnica de Elisa. *Revista Científica*. 2007;17(5):449-55.
- Duno F, F. García y M. Rivera. Prevalencia de la tripanosomiasis bovina en la Región Nor-Oriental del estado Falcón. *Acta Cient Venezolana*. 1992; 43 (Supl. 1):256.
- Guillén AT, León EA, Aragort W, Silva M. Diagnóstico de hemoparásitos en el Instituto de Investigaciones Veterinarias. Período 1986-2000. *Centro*. 2001;317:440.
- Sandoval E, Espinoza E, González N, Morales G, Montilla W, Jiménez D. Encuesta serohematológica en bovinos tripanosomiosus susceptibles de dos unidades agro-ecológicas del Valle de Aroa. *Rev Cient FCV-LUZ VIII*. 1998;3.
- uárez C, García F, Román D, Coronado A, Perrone T, Reyna A, et al. Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Trop*. 2009;27:363-72.



- Anosa V, Isoun T. Haematological studies on Trypanosoma vivax infection of goats and intact and splenectomized sheep. Journal of comparative pathology. 1980;90(1):155-68.
- Maikaje DB. Some aspects of the epidemiology and drug sensitivity of bovine trypanosomoses in Kaura Local Government Area of Kaduna State. PhD Thesis, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria. 1998:147 pp.
- García F, Rivera M, Ortega M, Suárez C. Trypanosomiasis equina causada por Trypanosoma evansi en tres hatos ganaderos del Estado Apure, Venezuela. Rev Fac Cs Vet. 2000;41:91-9.
- Suarez PC. Evaluación de los parámetros de la coagulación sanguínea en ovinos infectados experimentalmente con Trypanosoma vivax. Division de Postgrado FCV-UCV (Trabajo de grado). 2000:109 pp.
- Martínez N, Herrera P, Birbe B, Domínguez C, González C, Madrid-Bury N, et al. Relación entre la condición corporal y la respuesta reproductiva de hembras bovinas de doble propósito. Mejora de la Ganadería Mestiza de Doble Propósito Astro Data, Maracaibo, Venezuela. 1998;398:412.
- Ordoñez J, Bastardo, J., Chanto, C., Betancourt, R., Brito, C. Observaciones preliminares sobre la evaluación de condición corporal mediante contajes de costillas y su efecto sobre la tasa de concepción. . II Congreso Venezolano de Zootecnia. 1980:96 - 7 pp.
- Menendez M, Wiltbank, J. H. Calificación subjetiva de condición física y zoometría en vacas de vientre para carne. Técnicas pecuarias en México. 1985a;48:68 - 77.
- Pellín CES, González FAG, Baldizán G, Linarez FFM. Comportamiento parasitológico, clínico y hematológico em ovinos infectados experimentalmente con un aislado venezolano de Trypanosoma vivax. Vet Tropical. 2003;28(1).
- Sandoval E. Variaciones fisiopatológicas de la anemia en ovejas infectadas experimentalmente con Trypanosoma vivax. Trabajo de Grado de Maestría Maracay, Ven Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias Veterinarias Postgrado en Medicina Veterinaria. 1994.
- Lainson RaS, J. J. Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. Brit medo Buli. 1972;28:44.

