

# EVALUACIÓN PARASITOLÓGICA Y SEROLÓGICA DE INFECCIONES HEMOTRÓPICAS EN VENADOS DE COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*) EN VENEZUELA

## Parasitological and Serological Evaluation of Hemotropic Infections in White-Tailed Deers (*Odocoileus virginianus*) in Venezuela

Adriana Silva-Iturriza<sup>1,2</sup>, Ernesto Panier<sup>1</sup>, Armando Reyna-Bello<sup>3</sup>, Trina Perrone<sup>2†</sup> y Pedro Aso<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Simón Bolívar, Departamento de Biología Celular. <sup>2</sup>Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Centro de Biofísica y Bioquímica, Laboratorio de Fisiología de Parásitos. <sup>3</sup>Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez-IDECYT, Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios, Laboratorio de Inmunobiología \*58-212-9064216, pedrom@usb.ve

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar parasitológica y serológicamente la presencia de *Anaplasma* spp., *Trypanosoma* spp. y *Babesia* spp. en venados de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en una región del Edo. Apure, en la cual coexisten con bovinos (*Bos taurus*), equinos (*Equus caballus*) y chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*) infectados con estos hemoparásitos. Para ello se capturaron cinco venados de cola blanca en el hato El Cedral y se determinó la infección por estos patógenos mediante frotis de sangre y por ensayos serológicos, empleando la prueba de inmunofluorescencia e inmunoblot (Western Blot) en la cual se utilizaron como antígenos, extracto soluble de *Trypanosoma evansi* y la proteína recombinante mayor de superficie MSP5 de *Anaplasma marginale*. Mediante observación de frotis sanguíneo, dos venados resultaron positivos a *A. marginale* y ninguno a *Trypanosoma* spp. o *Babesia* spp. Por otro lado, un venado resultó positivo serológicamente a *A. marginale* y dos a *T. evansi*. Estos resultados sugieren que *Odocoileus virginianus* podría estar participando en el ciclo natural de la rickettsia *A. marginale* y de *T. evansi*, en conjunto con otros hospedadores como *Bos taurus*, *Equus caballus* y *Hydrochoerus hydrochaeris* de esta región de Venezuela.

**Palabras clave:** Hemotrópicos, *Anaplasma*, *Trypanosoma*, venados, Venezuela.

### ABSTRACT

The objective of this research was the parasitology and serology evaluation of the presence of *Anaplasma* spp., *Trypanosoma* spp. and *Babesia* spp. in white tail deer (*Odocoileus virginianus*) in a region of Apure State in which they coexist with infected bovines (*Bos taurus*), horses (*Equus caballus*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). For that, five white-tailed deer were captured in the Cedral Ranch, and the infection by these parasites was explored through blood smear and serological assays by immunofluorescence and immunoblot (Western Blot) using as antigens the soluble sonicated of *Trypanosoma evansi* and the recombinant Major Surface Protein (MSP5) of *Anaplasma marginale*. Two deers were detected positive for *Anaplasma marginale* by stained blood smear and no positives for *Trypanosoma* spp. or *Babesia* spp. One deer was seropositive for *A. marginale* and two were seropositive for *Trypanosoma evansi*. The above results suggest that the *Odocoileus virginianus* could be participating in the natural hemotropic cycle of *A. marginale* and *T. evansi*, together with the extensive production of *Bos taurus*, *Equus caballus* and *Hydrochoerus hydrochaeris* in this region of Venezuela.

**Key words:** Hemotrópicos, *Anaplasma*, *Trypanosoma*, deers, Venezuela.

### INTRODUCCIÓN

La anaplasmosis, tripanosomosis y babesiosis son enfermedades de interés veterinario que afectan a una amplia gama de mamíferos propiciando grandes pérdidas económicas en explotaciones de bovinos (*Bos taurus* y *Bos indicus*) [14].

La anaplasmosis bovina es causada principalmente por *Anaplasma marginale* [2,13] organismo que se localiza dentro de los glóbulos rojos, tiene forma esférica y un tamaño de 0,2 a 1 µm [6]. El *A. marginale* es transmitido principalmente por garrapatas Ixodidae, tales como *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *Dermacentor* spp. [9].

La babesiosis es causada por hemotrópicos intraeritrocíticos del género *Babesia*, y su morfología se asemeja a una pera con dimensiones que oscilan entre 1 a 5 µm. Su transmisión ocurre principalmente por garrapatas (*Boophilus microplus*) [8]. En Latinoamérica, la babesiosis bovina es causada por *B. bigemina* y por *B. bovis* [15] y la babesiosis equina por *Theileria equi* y *Babesia caballi* [21].

En Suramérica es aceptado generalmente que, la tripanosomosis bovina es causada por *Trypanosoma vivax* y la tripanosomosis equina por *T. evansi* y *T. equiperdum* [16]. Los tripanosomas son parásitos extracelulares que en su forma tripomastigota poseen una longitud que varía ampliamente entre 2 y 33 µm. La región anterior es cónica con núcleo en posición central, poseen un flagelo y una membrana ondulante. En América son transmitidos mecánicamente por dípteros hematófagos [4].

Estas enfermedades están ampliamente distribuidas, tanto en Venezuela como en otros países tropicales y subtropicales, causando efectos negativos en la salud y productividad del ganado bovino y equino [14]. Anteriormente, se ha reportado el venado (*Odocoileus virginianus*) como reservorio de la anaplasmosis bovina [3, 17], así como también se ha encontrado o infectado experimentalmente *T. evansi* y *T. vivax* en venados silvestres [1, 5, 20]. Respecto a la babesiosis, no se ha reportado en venados la presencia de los géneros que causan la babesiosis bovina o equina, sin embargo, estos ungulados presentan otras especies silvestres de *Babesia* spp. [11].

Debido al interés que existe en la salud y productividad del ganado bovino y equino, el principal objetivo del presente trabajo fue evaluar directa e indirectamente la presencia de: *A. marginale*, *T. vivax*, *T. evansi* y *Babesia* spp. en venados de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), los cuales coexisten, tanto con el ganado bovino como con el equino, en los llanos de Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

El muestreo fue realizado en el hato "El Cedral", municipio Mantecal, estado Apure, Venezuela, en los meses de mayo y septiembre del 2001. Se capturaron cinco venados y con la finalidad de tranquilizarlos se utilizó un rifle de dardos (DIS-50K, ACES, EUA.) conteniendo 100 mg de Xilazina y 200 mg de Ketamina; al concluir el muestreo se utilizó como reversor 2 mL de Yohimbine. Una vez sedado el animal fue identificado con un zarcillo de plástico que se colocaba en la oreja

derecha, cada zarcillo contenía una letra del abecedario (A; B; C; D; E), de esta manera se evitó la recaptura del animal. Una vez capturado y dormido el animal se sangró de la vena yugular por medio de una punción con una jeringa estéril, recolectando la muestra de sangre en tubos con y sin sal sódica del ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) a una concentración final de 0,15%. Del tubo sin EDTA se obtuvo el suero para la detección de anticuerpos anti agentes hemotrópicos y las muestras conteniendo EDTA se usaron para el diagnóstico parasitológico.

### Diagnóstico parasitológico

Las muestras de sangre colectadas en los tubos con EDTA fueron empleadas para determinar la infección activa por *Anaplasma* spp., *Trypanosoma* spp., y *Babesia* spp. mediante frotis de capa fina teñidos con May-Grunwald/Giemsa. La técnica de microhematocrito (Woo) se utilizó para detectar la presencia de *Trypanosoma* spp. en movimiento [23].

### Elaboración del conjugado Anti- IgG de venado para los ensayos serológicos

Inmunoglobulinas G (IgG) de venado purificadas según la metodología descrita [7] fueron utilizadas para producir un inmunosuero anti-IgG de venado en conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Para ello 1, mg de proteína emulsificada en 1 mL de adyuvante completo de Freund se inoculó por vía subcutánea en un conejo. New Zeland. Una segunda inoculación se administró luego de 21 días (d), empleando el mismo protocolo pero con adyuvante Incompleto de Freund. A los 15 d se sangró el conejo por la vena marginal de la oreja, el suero obtenido se almacenó a -20°C (refrigerador G&E, Venezuela) y posteriormente se utilizó para purificar IgG de conejo anti-IgG de venado que fueron acopladas a peroxidada [22] para obtener un conjugado a ser utilizado en el ensayo inmunoenzimático de Western Blot o con fluoresceína para los ensayos de inmunofluorescencia indirecta [18].

### Ensayo serológico "Western Blot"

Este ensayo se utilizó para detectar anticuerpos anti-*Trypanosoma* spp. y anti-*Anaplasma marginale* utilizando como material antigénico, extractos de *T. evansi* y la proteína recombinante Mayor de Superficie 5 (MSP5r de sus iniciales en inglés) de *Anaplasma marginale* [10, 12]. El material antigénico (MSP5r y extractos de *T. evansi*) fueron sometidos a una electroforesis en geles de acrilamida al 12%, en condiciones disociantes, posteriormente electro-transferidos a una membrana de nitrocelulosa [19]. Para ello se incubó el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa y los filtros (Nº 1703960, BioRad, Hercules, EUA) en tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris 48 mM, SDS 0,0375 %, metanol 20% pH 8.0). Posteriormente se realizó la transferencia en el sistema Trans-Blots semi-dry (BioRad, Hercules, EUA), sometiendo el mismo a una corriente constante de 150 mA por 45 minutos (min). Una vez transferidas las proteínas a la membrana de ni-

trocelulosa se procedió a realizar el ensayo, iniciando con un bloqueo durante 1 hora en solución salina tamponada (Tris-HCl, pH 7,5 con 5% de leche descremada). Posteriormente, las membranas fueron incubadas a 4°C con los diferentes sueros diluidos 1:50 en la misma solución salina tamponada (diluida 1:3) hasta el día siguiente, se lavó con la solución salina tamponada conteniendo 0,05% Tween-20, y se incubó el conjugado anti-venado diluido 1:250. Finalmente se lavó nuevamente y se visualizó la reacción con la solución 4-Cloro 1-naftol (Sigma, San Luis, EUA) y agua oxigenada. Como controles positivos se utilizaron suero de un bovino infectado experimentalmente con *A. marginale* y suero de un ovino (*Ovis aries*) infectado experimentalmente con *T. evansi*. Como control negativo se utilizó suero de un ovino sano.

### Ensayo serológico de inmunofluorescencia indirecta

Este ensayo se utilizó para detectar la posible presencia de anticuerpos anti-*T. evansi* y anti-*Babesia* spp., utilizando como material antigénico frotis sanguíneos de un ratón (*Mus musculus*) fijados con acetona el cual fue infectado experimentalmente con *T. evansi*, cuya parasitemia era de  $5-6 \times 10^6$  Tripanosomas/mL y frotis sanguíneos de un bovino infectado experimentalmente con *Babesia bovis*, cuya parasitemia era de 2,42%. Siguiendo la metodología de Todorovic y Long [18], la sangre, tanto del ratón como del bovino fue lavada con tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 y resuspendida en PBS al 2% albumina bovina. Posteriormente se realizaron los frotis de sangre, los cuales se fijaron con acetona. Utilizando material oleoso, se demarcó la región en la que se colocaron los sueros problemas, los mismos se prepararon a una dilución 1:40 y se incubaron en un envase de plástico por 30 min a 37°C. Luego se hizo un lavado con PBS y se añadió en cada pozo el conjugado IgG de conejo anti-IgG de venado acoplado a fluoresceína y se incubó a 37°C por 30 min. Posteriormente se realizó un último lavado y se observaron los frotis bajo el microscopio para fluorescencia (Leitz epiiluminación, 100x, Alemania) en un cuarto oscuro. Como control positivo se utilizó suero de un ratón infectado experimentalmente con *T. evansi* y suero de un bovino infectado experimentalmente con *B. bovis*, y como control negativo suero de ratón y bovino sanos.

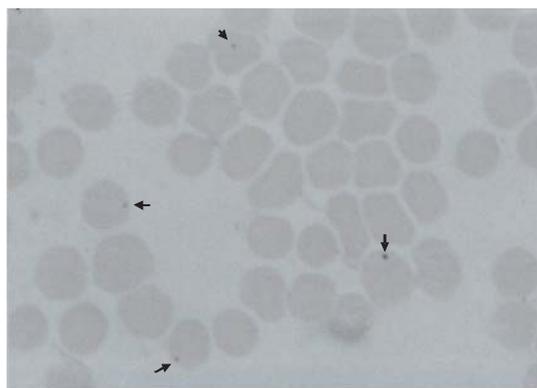
### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los cinco venados capturados, solo dos, el D y el E, resultaron positivos a *A. marginale* utilizando el diagnóstico parasitológico, TABLA I y FIG. 1, con una parasitemia de 1,14 y 1,51%, respectivamente. En la FIG. 2 se pudo observar que, solo el suero del venado A presentó una mayor reactividad anti-MSP5r de *Anaplasma marginale*, a pesar de que en los frotis sanguíneos de dicho venado no se encontró este hemotrópico. Por otra parte, en la FIG. 3 se observó que los sueros de los venados C y D presentaron una intensa banda de reacción con un polipéptido de aproximadamente 58 Kd del extracto antigénico, lo cual es consistente con la presencia de anticuerpos anti-*Trypanosoma* spp.

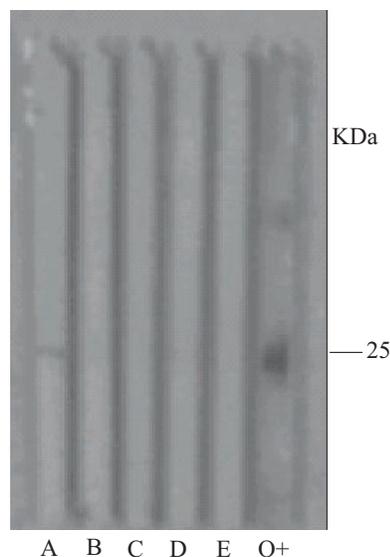
**TABLA I**  
**DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO POR FROTIS SANGUÍNEOS COLOREADOS**

Venado	<i>Anaplasma</i> spp.	<i>Trypanosoma</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.
A	Negativo	Negativo	Negativo
B	Negativo	Negativo	Negativo
C	Negativo	Negativo	Negativo
D	Positivo (1,14%)	Negativo	Negativo
E	Positivo (1,51%)	Negativo	Negativo

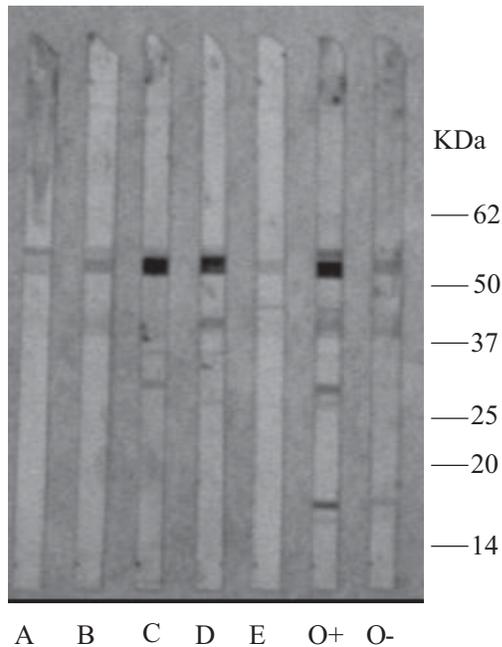
Entre paréntesis valores expresados como porcentaje de eritrocitos infectados en 100 campos observados.



**FIGURA 1. FROTIS SANGUÍNEO DE VENADO (*Odocoileus virginianus*) FIJADO Y COLOREADO CON MAY-GRUNWALD/GIEMSA (100x) MOSTRANDO ERITROCITOS INFECTADOS CON *Anaplasma marginale*. LOS CUERPOS DE INCLUSIÓN (FLECHAS) ESTÁN LOCALIZADOS EN LA PERIFERIA DEL ERITROCITO.**



**FIGURA 2. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO “WESTERN BLOT” CONTRA LA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *Anaplasma marginale* (MSP5R). LAS LÍNEAS A, B, C, D Y E INDICAN LA IDENTIFICACIÓN DE LOS SUEROS DE VENADO. LA LÍNEA O+ REPRESENTA EL CONTROL POSITIVO (SUERO DE OVINO EXPERIMENTALMENTE INFECTADO CON *Anaplasma marginale*).**



**FIGURA 3. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO “WESTERN BLOT” CONTRA EXTRACTOS DE *T. EVANSI*. LAS LÍNEAS A, B, C, D Y E INDICAN LA IDENTIFICACIÓN DE LOS SUEROS DE VENADO. LA LÍNEA O+ Y O- REPRESENTAN EL CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO (SUERO DE OVINO EXPERIMENTALMENTE INFECTADO CON *T. evansi* Y SUERO DE OVINO SANO).**

Con el ensayo de inmunofluorescencia indirecta se encontró nuevamente que los sueros de los venados C y D tenían anticuerpos anti-*Trypanosoma* spp, y no se observó ninguna reacción anti-*Babesia* (no mostrado).

De los tres géneros de hemotrópicos (*Anaplasma*, *Trypanosoma* y *Babesia*) buscados en venados (*Odocoileus virginianus*) en este estudio, solo *A. marginale* fue encontrado de forma directa por frotis de sangre en los venados D y E. El suero del venado A reaccionó positivamente contra la proteína recombinante de *A. marginal* (rMSP5), sin embargo, no se observó este hemotrópico en la sangre de este venado, lo cual sugiere que la presencia de este microorganismo era muy baja o inexistente pero que ciertamente estuvo infectado en algún momento con esta rickettsia pues aún se muestra seropositivo. Contrariamente los venados D y E fueron seronegativos pero positivos parasitológicamente. Esto es consistente con la posible presencia de una infección reciente que aún no ha generado una respuesta inmune por anticuerpos detectables. Los sueros de los venados C y D reaccionaron consistentemente de forma positiva por Western Blot e inmunofluorescencia indirecta a *T. evansi*, aunque la presencia del parásito no pudo ser detectada por métodos directos. Debido a la reacción cruzada que existe dentro de género *Trypanosoma*, la sola presencia de anticuerpos anti *T. evansi* no permite diferenciar la especie de este protozoo entre *T. evansi* o *T. vivax*.

## CONCLUSIONES

La observación directa de *Anaplasma marginale* mediante frotis sanguíneos y la detección de anticuerpos anti- *A. marginale* y anti- *T. evansi* sugiere que el venado *Odocoileus virginianus*, podría estar participando como hospedador o reservorio natural en esta área de los llanos de Venezuela. Este estudio abre una línea de investigación para comprobar si realmente el venado *Odocoileus virginianus* es reservorio natural de *A. marginale* y *T. evansi* que afectan de forma negativa el ganado bovino y equino en Venezuela. Para esto, es necesario estudiar otros factores como la identificación de los vectores en el área, el potencial de transmisión de los hemotrópicos del venado a bovinos y equinos, y *viceversa*, así como la patogenicidad de los hemotrópicos provenientes del venado y que pudieran transferirse al ganado.

## AGRADECIMIENTO

Trabajo de investigación realizado con el apoyo financiero del Decanato de Investigación y Desarrollo de la Universidad Simón Bolívar y del FONACIT a través de los proyectos G97-00634 y G98-003462.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRUN, R.; HECKER, H.; LUN, Z.R. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). **Vet. Parasitol.** 79:95-107. 1998.
- [2] CORONA, B.; RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ, S. Anaplasmosis bovina (bovine anaplasmosis). **Rev. Electrón. Vet.** VI:1-27. 2004.
- [3] DE LA FUENTE, J.; VICENTE, J.; HOFLE, U.; RUIZFONS, F.; FERNÁNDEZ, I.G.; VAN DEN BUSSCHE, R.A.; KOCAN, K.M.; GORTAZAR, C. Anaplasma infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. **Vet Microbiol.** 100:163-173. 2004.
- [4] DESQUESNES, M. Trypanosomes. **Livestock Trypanosomes and their Vectors in Latin America.** World Organization for Animal Health (OIE) Paris. 174 pp. 2004.
- [5] FIASSEON, R.; MAYER, M.; PIFANO, F. El ciervo (*Odocoileus gymnotis*) portador del *Trypanosoma vivax* en Venezuela. **Rev. Gracol. Zoot. Hig. Med. Vet.** 2:944-946. 1948.
- [6] GIARDINA, S.; BRETANA, A.; MÁRQUEZ, N. Ultrastructural aspects of intraerythrocytic development of a Venezuelan strain of *Anaplasma marginale*. **Tropenmed. Parasit.** 34:7-10. 1983.

- [7] HARLOW, E.; LANE, D. Immunoassay. En: **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Pp 283-318. 1988.
- [8] HOMER, M.J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD, S.R.; KRAUSE, P.J.; PERSING, D.H. Babesiosis. **Clinic. Microbiol. Rev.** 13:451-469. 2000.
- [9] KOCAN, K.M. Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. **Vet. Parasitol.** 57:121-151. 1995.
- [10] LANHAM, S.M.; GODFREY, D.G. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. **Exp. Parasitol.** 28:521-534. 1970.
- [11] PENZHORN, B.L. Babesiosis of wild carnivores and ungulates. **Vet. Parasitol.** 138:11-21. 2006.
- [12] REYNA-BELLO, A.; CLOECKAERT, A.; VIZCAINO, N.; GONZATTI, M. I.; ASO, P.M.; DUBRAY, G.; ZYGMUNT, M.S. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** 5:259-262. 1998.
- [13] RISTIC, M. Anaplasmosis. **Adv. in Vet. Sci.** 6: 111-192. 1960.
- [14] RIVERA, M.A. Tripanosomiasis. En: **Hemoparasitosis Bovinas**. Universidad Central de Venezuela, Caracas. 15 pp. 1996.
- [15] SANTOS, H.Q.; LINHARES, G.F.; MADRUGA, C.R. Estudo da prevalência de anticorpos anti-Babesia bovis e anti-Babesia bigemina em bovinos de leite da microrregião de Goiânia determinada pelos testes de imunofluorescência indireta e ELISA. **C. A. B.** 2:133-137. 2001.
- [16] SILVA, R.A.; SEIDL, A.; RAMÍREZ, L.; RIVERA, A.M. *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax*. **Biología, Diagnóstico e Controle**, Embrapa Pantanal, Corumbá. 141 pp. 2002.
- [17] SMITH, R.D.; WOOLF, A.; HUNGERFORD, L.L.; SUNDBERG, J.P. Serologic evidence of *Anaplasma marginale* infection in Illinois white-tailed deer. **J. Am. Vet. Med. Ass.** 181:1254-1256. 1982.
- [18] TODOROVIC, R.A.; LONG, R.F. Comparison of indirect fluorescent antibody (IFA) with complement fixation (CF) tests for diagnosis of Babesia spp infections in Colombian cattle. **Tropenmed Parasitol.** 27:169-181. 1976.
- [19] TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76:4350-4354. 1979.
- [20] TUNTASUVAN, D.; MIMAPAN, S.; SARATAPHAN, N.; TRONGWONGSA, L.; INTRARAKSA, R.; LUCKINS, A.G. Detection of *Trypanosoma evansi* in brains of the naturally infected hog deer by streptavidine-biotin immunohistochemistry. **Vet. Parasitol.** 87:223-230. 2000.
- [21] VARGAS, D.; BONET, R.; OLIVA, P.; CAMPANO, S. Implementación de la técnica de PCR en la identificación de Babesia ssp en equinos. **Parasitol. Latinoam.** 59:179-182. 2004.
- [22] WILSON, M.B.; NAKANE, P.K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: **Immunofluorescence and Related Staining Techniques**. Knap K. Holubar, y G. Wick, (Eds). Elsevier North Holland Biochemical Press, New York. Pp 215-224. 1978.
- [23] WOO, P.T. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. **Can. J. Zool.** 47:921-923. 1969.