

# Evaluación en campo de un ELISA indirecto, desarrollado con productos antigénicos especie-específicos de *Trypanosoma vivax* para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina. Fases: I-Preparación y rendimiento de los antígenos, y II-Validación del Ac-ELISA homólogo

Tamasaukas, R<sup>1\*</sup>, Tamasauskas, C<sup>1</sup>, Cobo, M<sup>2</sup>, Rivera, S<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología, Investigación y Prestación de Servicios en Sanidad Animal (LABIPRESAN), Universidad Nacional Experimental de los Llanos, Venezuela.

<sup>2</sup> Postgrado de Estadística, Facultad de Agronomía (FAGRO), Universidad Central de Venezuela (UCV), Venezuela.

<sup>3</sup> Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia (LUZ), Venezuela.

Autor de correspondencia: rtamasa@hotmail.com

## 1. INTRODUCCIÓN

Métodos serológicos como el ensayo inmunoenzimático indirecto con antígenos derivados de *T. evansi* (*T. evansi*-Ac-ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI), parecieran ser los métodos que han proporcionado los mejores resultados para la determinación de tripanosomosis bovina. Sin embargo, sus principales deficiencias son no poder discriminar entre infecciones recientes y pasadas, y, en cuanto a la *T. evansi*-Ac-ELISA, no diferenciar entre reacciones cruzadas con otros patógenos con los que *T. vivax* comparte similitud antigénica como *T. evansi* y *T. theileri* (Desquesnes, 1997; Morlais, Ravel, Grébaut, Dumas, & Cuny, 2001). Se ha utilizado la compatibilidad genética con *T. evansi* para justificar el uso de antígeno de este parásito en la elaboración de la Ac-ELISA, para el diagnóstico de *T. vivax* (Uzcanga, Mendoza, Aso, & Bubis, 2002), esto genera inconvenientes en zonas donde la tripanosomosis por *T. evansi* también sea endémica, y atribuir reacciones positivas observadas a la presencia de *T. evansi* en bovinos con ausencia de *T. vivax*, condición que fuera reportada por Toro, López, León, Ruiz, García *et al.* (1980).

El presente trabajo, realizado entre 2013 y 2015, tuvo como propósito la obtención de una base de datos actualizados sobre la caracterización epidemiológica de la tripanosomosis bovina con el soporte diagnóstico de un estuche de ELISA indirecto, elaborado por el Laboratorio de Biotecnología, Investigación y Prestación de Servicios en Sanidad Animal (LABIPRESAN) de la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Centrales Rómulo Gallegos (UNERG), con procesos innovadores de producción de antígenos autóctonos especie-específicos de *T. vivax*, y subsanar así las principales deficiencias de los antígenos heterólogos de *T. evansi*, específicamente, no diferenciar entre reacciones cruzadas con otros patógenos con los que *T. vivax* comparte similitud antigénica como *T. evansi* y *T. theileri* (Desquesnes 1997; Morlais *et al.*, 2001; Osório, Madruga, Desquesnes, Soares, Ribeiro *et al.*, 2008).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Zona geográfica y fincas de muestreo

El muestreo se realizó en 18 fincas, seleccionadas al azar, en dos estados del eje centro-llanero: seis fincas localizadas en los municipios de San Sebastián de Los Reyes y de Camatagua, del sur del estado Aragua, y 12 fincas ubicadas en los municipios Mellado, Miranda, Las Mercedes del Llano, San José de Guaribe, Ribas y Santa María de Ipire del estado Guárico; zonas geográficas y agroecológicas representativas de la Altiplanicie de los Llanos Centrales de Venezuela.

## 2.2. *Animales experimentales*

En Aragua, se obtuvieron muestras al azar de 120 bovinos de doble propósito, hembras y machos adultos y de otras edades. En Guárico se analizaron muestras al azar de 527 bovinos de doble propósito, hembras y machos adultos y de otras edades.

## 2.3. *Valores hemáticos, diagnósticos parasitológicos y serológicos*

La determinación de hematocrito (Hto) y de Hemoglobina (Hgb) se efectuó por la técnica directa QBC Idexx®. La prevalencia parasitológica y la cuantificación de la parasitemia por *T. vivax* y otros hemotrópicos se realizó con la técnica de QBC Idexx® con lectura en microscopio de epifluorescencia y por frotis de capa blanca coloreado con Giemsa al 10% en 200 campos microscópicos (Paris, Murray, & Moodimba, 1982).

La obtención de suero y plasma para la técnica de ELISA indirecta homóloga, fue realizada con productos especie-específicos de un aislado de campo de *T. vivax*, identificado mediante la técnica de ampliación del ADN reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y por caracteres fenotípicos: morfología, biometría y nivel de parasitemia del parásito; valores hemáticos de hematocrito y hemoglobina y color de las mucosas en los bovinos muestreados. El aislado además fue seleccionado en base a los valores de prevalencia y seroprevalencia encontrados en el estado, a fin de caracterizar zonas de baja, media y alta prevalencia (seroprevalencia) en el mayor número de muestras posibles, en base a estudios referenciales.

Los 3 tipos de productos antigénicos probados fueron extractos crudos totales (ExCT), extractos solubles citosólicos purificados fraccionados (ExSCPF) y extractos desnaturalizados (ExD). Los antígenos especie-específico fueron preparados por técnicas de aislamiento y concentración de tripanosomas salivarios, mediante columnas de intercambio aniónico de DEAE-celulosa, previamente separados por gradiente de Percoll, se dispensaron en alícuotas y se criopreservaron a -70°C hasta su utilización posterior. Esto, con el fin de determinar seroprevalencia. La prueba de referencia fue la IFI (Tamasaukas, Agudo-Castellanos, Silva-Ravelo, Florio-Luis, Vintimilla-Tamasaukas *et al.*, 2010).

## 2.4. *Validación del Ac-ELISA homólogo*

La validación del Ac-ELISA con los extractos antigénicos de *T. vivax* se realizó por pruebas de sensibilidad, especificidad y valores predictivos con ensayos de repetibilidad/reproducibilidad, determinación de eficiencia y eficacia como principios de la estandarización de técnicas. La Ac-ELISA, fue realizada en una serie de 15 ensayos, 5 réplicas para cada uno de los 3 extractos antigénicos (ensayos), sobre diferentes placas y en diferentes días, empleándose los sueros controles fuertemente positivos (media del pool de los mayores valores de D.O.), medianamente positivos (media de las D.O.) débiles positivos (media del pool de los menores valores de D.O.) y negativos. El coeficiente de variación intra y entre ensayo fue determinado según Tijssen (1993) y Jacobson (1998) aceptándose como válidos valores de coeficientes de variación (CV) igual o menores al 10%. Los sueros controles de referencia fueron donados por el CIRDES, Burkina Faso, África Occidental.

Para la preparación de sueros controles positivos y negativos, nacionales, se realizaron infecciones experimentales con el aislado de *T. vivax* en condiciones controladas, se obtuvieron sueros controles positivos titulados (débil, mediana y fuertemente positivos, Ac policlonales) y sueros negativos, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta, ELISA y PCR, provenientes de animales positivos (con parasitemia conocida, Ac policlonales) y negativos a las técnicas parasitológicas directas (por QBC, frotis coloreados de sangre completa, de capa blanca y PCR) e indirectas (IFI, Ac-ELISA).

## 2.5. *PCR*

El protocolo utilizado de PCR para detección de *T. vivax* fue el establecido por Bolívar (2013).

## 2.6. Análisis estadísticos

Se realizaron pruebas estadísticas descriptivas, ANAVAR, prueba de medias de Tukey y tablas de contingencia 2x2 para sensibilidad y especificidad. Se determinó el porcentaje de concordancia con respecto a la prueba de referencia, el cual se obtuvo con el número de sueros cuyos resultados fueron coincidentes con los de referencia en base a 100. Esto permitió calcular el índice *Kappa*. (Tamasaukas, 1995).

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Evaluación de extractos antigénicos de *T. vivax*

El aislado se denominó GUÁRICO/12/LABIPRESAN/001/*T. vivax*, acorde con lo establecido por Lumsden (1977) y lo revisado por Cortez, Ventura, Rodrigues, Batista, Paiva *et al.* (2006). Los extractos antigénicos crudos totales y desnaturalizados, a las mismas concentraciones, resultaron con menores valores de sensibilidad y especificidad, 95% y 90%, y 96% y 90%, respectivamente, por lo que no fueron validados para el Ac-ELISA en campo; seleccionándose los ExSCPF como fuente de antígenos, a las concentraciones de 20 µg y 40 µg. La concentración de 20 µg del extracto antigénico ExSCPF del *T. vivax* no presentó diferencias significativas con la de 40 µg, por lo que la primera de ellas (20 µg) resultó ser la cantidad de proteína antigénica especie-específica de *T. vivax* recomendada, economizándose reactivos para el desarrollo de la técnica de ELISA, ya que para la Ac ELISA heteróloga con *T. evansi* se requiere de 40 µg ml<sup>-1</sup> hasta 150 µg ml<sup>-1</sup> de material antigénico en diversos protocolos. La eficacia del Ac ELISA homólogo (antígenos de *T. vivax*) con ExSCPF a 20 µg fue del 99%, en tanto que con ExSCPF a 40 µg fue menor (96.5%).

En estudios de IFI con *T. vivax* y Ac-ELISA con antígeno de *T. evansi* las diferencias son significativas, dada la especificidad de especie del material antigénico, que contrasta con la reactividad cruzada enunciada por algunos autores que valoran el uso de Ac-ELISA heteróloga sólo con la ventaja de ésta última, fundamentalmente debido a la mayor facilidad para la expansión y purificación de los parásitos durante la preparación de los antígenos. Ventaja que se superaría con *T. vivax*, manteniendo los extractos antigénicos especie-específicos en alícuotas en criopreservación, para lo cual se requieren estudios de evaluación de la viabilidad de dicho material a lo largo del tiempo. Además, la concentración de material antigénico para la Ac-ELISA, en este caso de productos especie-específicos de *T. vivax* (20 µg ml<sup>-1</sup>), es menor que la utilizada en los protocolos de Ac-ELISA con *T. evansi*, que requieren al menos de 40 µg de material antigénico para cada pocillo de la microplaca.

Los menores valores de prevalencia serológica observada con el extracto antigénico ExSCPF del *T. vivax* en algunas fincas, se explican por la convivencia en esos predios con poblaciones de chigüires y ovinos, especies que son reservorios de *T. evansi*, de allí que, el Ac ELISA heterólogo estaría dando resultados falsos positivos a *T. vivax* por la reactividad cruzada que expresa aquel sistema. En cuanto a la repetibilidad/reproducibilidad de los ensayos, se observó que todos los valores presentaron coeficientes de variación igual o menor al 13%, establecido como estándar válido. Así mismo, en la repetibilidad del ensayo (intra-ensayo) el coeficiente de variación presentó valores mucho menores (2.80 a 6.00%) que los observados en la reproducibilidad del ensayo (entre ensayos) cuyo valor máximo fue de 10%.

En el proceso de validación se determinaron los siguientes valores: a) Índice de validez: proporción correcta de aciertos, definen la proporción de individuos clasificados correctamente, siendo de 96.5% para Ac-ELISA y 99.3% para IFI. b) Índice de Youden: cercanos a 1, mayor en IFI que en ELISA, aunque ambos resultados son eficientes, visto que cuánto más cercano a 1, mejor desempeño de la prueba diagnóstica que se está evaluando, sin relacionar la S y E de ambas pruebas. c) Índice de Verosimilitud: indicador de riesgo relativo, reflejaron buen desempeño de los ensayos, mucho mayor la positiva en IFI (64.01) que en Ac-ELISA (24.48), en ambas técnicas; es evidente que se desprende el complemento la respuesta a la pregunta ¿cuántas veces es más probable que la prueba sea negativa en los positivos que en los no positivos? Una buena prueba debe tener una RV- cercana a 0 y una RV+ alta (no es posible especificar un límite superior para la RV+). La razón de verosimilitud combina la

información que proviene de la sensibilidad y la especificidad, y es definida como la razón entre la probabilidad de un resultado de una prueba en sujetos enfermos o infectados o positivos y la probabilidad del mismo resultado en sujetos no enfermos o no infectados o no positivos.

### 3.2. Valores de absorbancia (D.O.) de las réplicas por tipo de extracto antigénico de *T. vivax*

Se observan los valores encontrados de densidades ópticas en los 15 ensayos (5 réplicas, 3 ensayos) de cada extracto antigénico de *T. vivax* evaluado, obteniéndose puntos de corte variables, con valor mínimo de 0.209 (ExD) y máximo de 0.583 (ExSCPF). En el presente trabajo, el punto de corte se determinó como la media más 2 desviaciones estándar de 3 controles negativos, visto que los sueros controles débil y fuertemente positivos y los controles negativos, provienen de animales experimentales y de campo, probados por IFI, cuyas muestras fueron caracterizados a través de métodos parasitológicos directos (Woo, frotis delgado de capa blanca, coloreados con Giemsa al 10% y QBC®) y serológicos (IFI y ELISA indirecto).

### 3.3. PCR

De las corridas electroforéticas se demostraron las bandas de 210 pares de bases, esperadas por los cebadores utilizados, correspondientes a los materiales de *T. vivax*, en base a sus controles positivos y negativos, respecto a especies con distancia filogenética muy separadas entre sí, a saber, *T. brucei*, *T. congolense savannah* y *T. congolense forest* de origen africano, aislados de animales infectados en forma experimental y controlada.

### 3.4. Valores hemáticos

En las fincas de Aragua, el valor del Hto fue de 37.7% y Hgb de 12.6%. La amplitud del rango en los valores de Hto y Hgb en cada rebaño, fue debida a la variabilidad de grupo racial en los animales, el estado fisiológico y la condición corporal y de peso; por lo que el rango mínimo de hematocrito, a partir del cual se considera anémico un animal, se debió definir para cada rebaño. Evaluando la asociación entre la condición corporal y color de las mucosas con los valores hemáticos y presencia de hemotrópicos se obtuvo que el 64.4% de los bovinos con condición corporal  $\leq 3$  mostraron presencia de al menos un tipo de hemotrópico (*T. vivax*, *A. marginale* y/o *Babesia spp.*), lo cual no es concluyente por cuanto la condición corporal también depende de otros factores como la nutrición y el estado fisiológico del animal.

Para la determinación del punto de corte y establecer el valor de anemia, se realizó el análisis de la distribución de frecuencias, el cual dió como resultado que los animales con Hto igual o menor a 30% fueran clasificados como anémicos. Un total de 302 animales presentaron valores de  $25\% \leq \text{Hto} \leq 30$ . Agudo, Tamasaukas, Silva, Sánchez, Ron *et al.* (2009) reportaron valores de Hto de 31.48% asociados significativamente con el color de la conjuntiva ( $P < 0.05$ ). El 35.82% con valores menores o iguales a  $10 \text{ g dl}^{-1}$  de hemoglobina. Sin asociación significativa entre prevalencia de *T. vivax* y valores aceptables de hematocrito.

### 3.5. Diagnóstico parasitológico

En Aragua, se obtuvo una carga parasitaria (parasitemia) de *T. vivax* 5%, *Anaplasma marginale* 12%, *B. bigemina* 1.3% y *B. bovis* 1.2% y una Prevalencia de *T. vivax* 37.7%, *Anaplasma marginale* 66.6%, *B. bigemina* 22.2% y *B. bovis* 13.3%. En relación a *A. marginale*, es común observar una prevalencia superior al 50% en rebaños bovinos del occidente del país en extendidos sanguíneos teñidos por métodos convencionales (Tamasaukas, Roa, Aguirre, Ron, & Cobo *et al.*, 2000) reportado en dos fincas bovinas Doble Propósito en el Municipio de Santa Rita de Manapire del estado Guárico.

Las infecciones concurrentes con otros hemotrópicos, así en la finca A: activas por *A. marginale* de 90% (CBC), 85% (FSC), por *Babesia spp.* (CBC) de 75%, 65% para *B. bigemina* y 15% para *B. bovis* (FSC), en la B, las activas por *A. marginale* fueron de 65.5% (CBC), 55.5% (FSC); para *Babesia spp.* de 45.5% (CBC), para *B. bigemina* de 28% (FSC); para *B. bovis* fue de 35% (FSC). La prevalencia en Guárico fue de 25.62% (intervalo de confianza al 95% entre 21.89% - 29.34%), en tanto Agudo *et al.*

(2009) reportaron la prevalencia de *T. vivax* con valores de 0.83% en fincas del Apure, 8.47% en Aragua, 16.66% en Barinas, 17.5% en Cojedes y 24.03% en Guárico, con diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

### 3.6. Diagnóstico serológico

En Aragua, el valor promedio de seroprevalencia por Ac-ELISA fue 95.5%, con sensibilidad del 90% y especificidad del 92%, concordancia del 97% e índice *kappa* de 0.93, en base a 100 sueros de referencia (50+ y 50-). En Guárico, la seroprevalencia general promedio fue de 88.65%, con diferencias significativas entre municipios, con un intervalo de confianza al 95% entre 85.95% y 91.36%. Los mayores valores de seroprevalencia se encontraron en los municipios Francisco de Miranda (95.96%) y Las Mercedes del Llano (92.5%) y el menor en Santa María de Ipire (72.91%). El valor de la seroprevalencia por Ac-ELISA fue mayor que los obtenidos con otros protocolos que utilizan antígenos de *T. evansi*.

Agudo *et al.* (2009) reportaron que la distribución porcentual promedio por finca fue de 85.76%, utilizando Ac-ELISA heteróloga con antígenos de *T. evansi*. En el presente estudio, el sistema Ac-ELISA homólogo empleado, con extractos solubles purificados especie-específicos de *T. vivax* bajo el proceso de producción de calidad, fue eficiente, mostrando una sensibilidad del 95% y especificidad del 96%, concordancia del 97% e índice *kappa* de 0.95 en base a 200 sueros de referencia (100+ y 100-). Estos valores son similares a los encontrados por Tamasaukas *et al.* (2010), quienes determinaron seroprevalencia de *T. vivax* por IFI en 88.8% y por Ac-ELISA de 95.5%, con sensibilidad del 96% y especificidad del 97%, concordancia del 97% e índice *kappa* de 0.93 en base a 90 sueros de referencia (45+ y 45-), utilizando un extracto especie-específico de *T. vivax* como fuente de antígeno para su adsorción en la placa de ELISA.

En otros estados como Apure, Táchira, Barinas, Mérida y Sur del Lago de Maracaibo, se han presentado problemas de hemotrópicos en bovinos, con valores entre el 20.8 y el 57.8% de animales con Trypanosoma, detectados a través de exámenes serológicos (Bolívar, García, Crisante, Rojas, Teixeira *et al.*, 2006). En Monagas, en bovinos cebú y mestizos *Bos taurus x Bos indicus*, se observó una seroprevalencia de *T. vivax* por el orden del 50.5%, con una elevada tasa de ataque de la infección de 51% (García, Alfaro, Reyna, Coronel, & Rangel, 2008). Para tripanosomosis, Alfaro, García, Toro, & Valle (1994) encontraron valores de seroreactores a *T. vivax* por IFI, del 25% y 50%, sugiriendo una mayor susceptibilidad de los animales adultos para contraer la enfermedad, afectando de manera similar a machos y hembras en una explotación (Toro *et al.*, 1980; Rey, 2004).

## 4. CONCLUSIONES

La prevalencia de *T. vivax* por encima del 20% denota una situación endémica de importancia sanitaria y más cuando se muestra en frotis sanguíneos. El extracto antigénico ExSCPF del *T. vivax* a una concentración de 20 µg resultó eficiente para detectar en campo el 92% de la prevalencia serológica de la tripanosomosis por Ac ELISA homóloga; lo cual es una ventaja ya que la cantidad de antígeno necesario es menor que la requerida para los Ac ELISA heterólogos (40-150µg). La innovación en la producción de los extractos solubles purificados fraccionados, antigénicos especie-específico de *T. vivax*, mostró en el sistema Ac-ELISA altos grados de sensibilidad, especificidad y eficacia, por lo que la técnica de producción resultó eficiente para el diagnóstico de anticuerpos anti-*T. vivax*, siendo el primer trabajo en el continente americano con un proceso de validación en laboratorio y en campo a fin de elaborar estuches de ELISA indirecto para escalamiento con un protocolo de estandarización robusto. Se demostró la presencia de la tetralogía hemotrópica con los 4 hemotrópicos concomitantes.

## AGRADECIMIENTOS

A los productores y a las productoras y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por el co-financiamiento con los Proyectos 2012001380, 2012001553 y 2012001789.

## REFERENCIAS

- Agudo, L., Tamasaukas, R., Silva, A., Sánchez, J., Ron, J., Fernández, M., Florio, F., Vintimilla, M., Colmenares, O., Rivera, S. (2009). Tipo bovino trypanotolerante y trypanosusceptible doble propósito en la región de los llanos Centrales de Venezuela. I: Identificación y caracterización fenotípica. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(10), 1-23.
- Alfaro, C, García, F, Toro, M, Valle, A. (1994). *Prevalencia de anaplasmosis bovina de acuerdo a factores intrínsecos del hospedador en bovinos del estado Monagas*. En: Memorias VIII Congreso Venezolano de Zootecnia. San Juan de Los Morros, Venezuela. sp
- Bolívar, A, García, P, Crisante, G, Rojas, A, Teixeira, M, Añez, N. (2006). Detección de infecciones subclínicas por *Trypanosoma vivax* en bovinos de fincas ganaderas de Mérida, Venezuela. Nota Científica. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 46(1), 199-212.
- Bolívar, A. M. (2013). Detección de *Anaplasma marginale* y *Trypanosoma vivax* en garrapatas de ganado bovino empleando la reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 14(3), 1-10.
- Cortez, A. P., Ventura, R. M., Rodrigues, A. C., Batista, J. S., Paiva, F., Añez, N., Machado, R. Z., Gibson, W. C., Teixeira, M. M. G. (2006). The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*, 133(2), 159-169.
- Desquesnes, M. (1997). Evaluation of simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Tropica*, 65, 139-148.
- García, F., Alfaro, C., Reyna, A., Coronel, R., Rangel, A. (2008). Caracterización de un brote de Tripanosomosis en un rebaño bovino de ceba del estado Monagas. *Revista Científica FCV- LUZ*, 18(Suplemento 1), 503.
- Jacobson, R. H. (1998). Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 17, 469-486.
- Lumsden, W. H. R. (1977). Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Annales De La Societe Belge De Medecine Tropicale*, 57(4-5), 361-368.
- Morlais, I, Ravel, S, Grébaud, P, Dumas, V, Cuny, G. (2001). New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Tropica*, 80(3), 207-13.
- Osório, A. L., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R., Costa, S. C. (2008). *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1-13.
- Paris, J., Murray, M., Moodimba, M. C. (1982). A comparative evaluation of parasitological techniques currently available for the diagnosis of african trypanosomiasis. *Acta Tropica*, 38, 307-316.
- Rey, C. (2004). Hemoparasitosis en América Latina: El Caso Venezuela. Red Electrónica de Garrapatas y Enfermedades Transmitidas por Garrapatas para América Latina y el Caribe, *RedEctopar*, 1-5.
- Tamasaukas, R. (1995). *Estudio General de la Trypanosomiasis Bovina*. Trabajo de Ascenso (Categoría Titular), 342 pp. Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos, San Juan de los Morros, Estado Guárico, Venezuela.

- Tamasaukas, R., Roa, N., Aguirre, A., Ron, J., Cobo, M. (2000). Tetralogía hemoparasitaria en algunas fincas bovinas del municipio Santa Rita, estado Guárico, Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela*, 8(4), 101-108.
- Tamasaukas, R., Agudo-Castellanos, L., Silva-Ravelo, A., Florio-Luis, J., Vintimilla-Tamasaukas, M., Rivera-Pirela, S. (2010). Hemoparasitosis en ganadería doble propósito venezolana, diagnóstico y control: una revisión. *Agronomía Mesoamericana*, 21(2), 367-381.
- Tijssen, P. (1993). *Practice and theory of enzymeimmunoassays*. Series Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. No. 15. Amsterdam: Elsevier Science, 576 pp.
- Toro, M., López, R., León, E., Ruiz, A., García, J. (1980). Resultados de un muestreo serológico sobre bovinos portadores de *Babesia*, mediante inmunofluorescencia indirecta. *Veterinaria Tropical*, 5(1), 3-8.
- Uzcanga, G., Mendoza, M., Aso, P., Bubis, J. (2002). Purification of a 64Kda antigen from *Trypanosoma evansi* that exhibits cross-reactivity with *Trypanosoma vivax*. *Parasitology*, 124, 287-299.