

# AISLAMIENTO DE *Trypanosoma evansi* EN LA ESPECIE CAPRINA UTILIZANDO LA TÉCNICA DE CENTRIFUGACIÓN POR INTERCAMBIO DE IONES.

GUTIERREZ, C.; CORBERA, J.A.; DORESTE, F.; BÜSCHER P<sup>1</sup>

Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria.

Universidad de Las Palmas, Arucas, 35416, Las Palmas, Islas Canarias

Correo electrónico de contacto: [cgutierrez@dpat.ulpgc.es](mailto:cgutierrez@dpat.ulpgc.es)

<sup>1</sup>Instituto de Medicina Tropical, B-2000 Antwerp, Bélgica.

## RESUMEN

Los tripanosomas salivares pueden ser separados de las células sanguíneas y plaquetas por el paso de la sangre de animales infectados a través de una columna de intercambio iónico, DEAE-celulosa. Basado en éste método, la técnica de centrifugación por intercambio de iones (mAECT) ha sido desarrollada por Lumsden *et al.* (1979) para su utilización en condiciones de campo. Sin embargo, la técnica debe ser adaptada a las especies de tripanosomas salivares y a los hospedadores mamíferos. El objetivo de éste estudio fue evaluar la mAECT en cabras infectadas con *T. evansi*. Así, 5 cabras adultas fueron inoculadas intravenosamente con, al menos,  $1 \times 10^5$  *T. evansi* aislado de un dromedario en Canarias. Los animales fueron mantenidos durante 8 meses y chequeados mensualmente para la presencia de parásitos y anticuerpos específicos. Los animales mostraron un curso subclínico de la infección. La parasitemia permaneció muy baja pero persistente. Para la sangre de cabra, el gel de la DEAE fue equilibrado con una solución glucosa salina fosfato-tamponada. Como conclusión, la técnica de la mAECT puede ser interesante para diagnosticar cabras con baja parasitemia de *T. evansi* y negativas a otras pruebas de detección del parásito.

**Palabras clave:** cabra, *Trypanosoma evansi*, parásitos sanguíneos, intercambio de iones.

## INTRODUCTION

Los tripanosomas salivares pueden ser separados de las células sanguíneas y plaquetas por pasaje de la sangre de mamíferos infectados a través de una columna de intercambio de iones (DEAE-cellulose) (Lanham, 1968). La separación depende fundamentalmente de las diferencias de cargas superficiales; la DEAE-cellulose adsorbe los componentes sanguíneos más cargados negativamente, mientras los cargados menos negativamente son rechazados (Lanham y Godfrey, 1970). Basado en éste hecho, Lumsden *et al.* (1979) desarrollaron la técnica de la Centrifugación por Intercambio de mini Aniones (mAECT) para su uso en seres humanos en condiciones de campo. Ésta técnica permite la separación de los tripanosomas de la sangre venosa y su concentración en la parte distal de un tubo por centrifugación lenta (3000 rpm) y su posterior visualización microscópica usando baja magnificación. Dado que las cargas superficiales difieren entre especies de tripanosomas salivares y que las cargas de los eritrocitos también varían de acuerdo con las diferentes especies mamíferas (Seaman y Unlenbruck, 1963), la técnica debe ser adaptada a las especies de tripanosomas salivares y a los hospedadores mamíferos. Respecto de la especie caprina, la técnica ha sido previamente utilizada para aislar *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* y *T. brucei brucei* (Seaman y Unlenbruck 1963). Así, el objetivo del presente estudio fue evaluar la mAECT en cabras infectadas con *T. evansi*.

## MATERIALES Y METODOS

### *Animales*

Cinco cabras canarias hembras fueron seleccionadas para este estudio. Los animales fueron comprados en una granja lechera comercial sin antecedentes de tripanosomosis y habían sido recientemente vacunados contra *Salmonella* spp. y *Chlamydia* spp. y también se les había administrado ivermectina contra parásitos externos e internos. Los animales fueron negativos a las pruebas serológicas y parasitológicas para detección de *T. evansi*. Las cabras fueron posteriormente inoculadas intravenosamente con, al menos,  $1 \times 10^5$  *T. evansi* aislados de un dromedario infectado en la isla de Gran Canaria. Los animales fueron mantenidos 8 meses, siendo sometidos a examen físico diario para detectar cualquier evidencia clínica de la enfermedad y mensualmente para detección del parásito y de anticuerpos específicos.

### **Pruebas de detección del parásito**

De cada animal se obtuvieron muestras sanguíneas mensuales de la vena yugular y receptadas en tubos conteniendo EDTA y heparina como anticoagulantes. Las pruebas utilizadas fueron el hematocrito, gota gruesa, frotis teñidos e inoculación en ratones tal y como descrito por la OIE (OIE, 2000). La técnica de la centrifugación de intercambio de iones (mAECT) fue también utilizada. El test fue proporcionado por el Instituto de Medicina Tropical, Amberes, Bélgica. Para la sangre de cabra, el gel de DEAE fue equilibrado con glucosa salina fosfato tamponado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhídrido): 8,088 g/L,  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0.468 g/L, NaCl: 2.55 g/L, glucosa: 10 g/L). Un volumen de 300  $\mu\text{L}$  de sangre heparinizada fue vertida en un volumen de 2.5 ml de gel DEAE. Después de la centrifugación del volumen colectado, la presencia de *T. evansi* fue evaluada mediante baja magnificación microscópica ( $10 \times 10$ ).

### **Parámetros hematológicos indirectos**

El hematocrito y las proteínas séricas totales fueron determinados para detectar los posibles efectos sobre la salud de los animales durante el experimento.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Las cabras inoculadas mostraron un curso subclínico de la enfermedad. El hematocrito disminuyó significativamente ( $P < 0,05$ ) y las proteínas séricas se incrementaron significativamente ( $P < 0,05$ ) debido al incremento de las globulinas.

La parasitemia permaneció muy baja pero persistente a lo largo de la experiencia. La mAECT resultó de mayor sensibilidad que los métodos del examen del frotis teñido y del hematocrito pero menor que la inoculación en ratones. Utilizando la mAECT, después de la centrifugación del volumen colectado, *T. evansi* fue detectado por su movilidad a microscopía de baja magnificación. La mAECT ha sido utilizada en cabras infectadas con *T. vivax*, *T. congolense* y *T. brucei*, aunque la sensibilidad obtenida fue baja. Sin embargo, sensibilidades similares han sido detectadas con *T. evansi* en antílopes (Sachs, 1984) y búfalos de agua (Holland *et al.*, 2001).

Se puede concluir que en cabras con parasitemia muy baja, la mAECT resulta eficaz cuando otras pruebas de detección del parásito han resultado ineficaces.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- LANHAM, SM. 1968. Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature*, 218, 1273-1274.
- LANHAM, SM; GODFREY, DG. 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*, 28, 521-34.
- LUMSDEN, WH; KIMBER, CD; EVANS, DA; DOIG, SJ. 1979. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: Adaptation for field use. *Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 312-317.
- SEAMAN, CVF; UNLENBRUCK, G. 1963. The surface structure of erythrocytes from some animal sources. *Archives Biochemistry Biophysical*, 100, 493-502.
- KALU, AU; LAWANI, FAG. 1986. Caprine trypanosomiasis: comparative study of parasitological diagnostic techniques in mixed subpatent infections. *Bulletin Animal Health Production Africa*, 34, 294-295.
- OIE, Office International des Épizooties. 2000. Surra (*Trypanosoma evansi*), Chapter X.11. En: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*, 4th ed. Roma, Italia.
- SACHS, R. 1984. The superiority of the miniature Anion-Exchange Centrifugation Technique for detecting low grade Trypanosome parasitaemias. *Transactions Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 78, 694-696.
- HOLLAND, WG; CLAES, F; MY, LN; THANH, NG; TAM, PT; VERLOO, D; BUSCHER, P; GODDEERIS, B; VERCRUYSSSE, JA. 2001. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*, 97, 23-33.

## **SUMMARY**

Salivarian trypanosomes can be separated from blood cells and platelets by passing blood from infected mammals through a column with the anion exchanger, DEAE-cellulose. Based on this technique, the mini Anion Exchange Centrifugation Technique (mAECT) has been developed for use in the field by Lumsden *et al.* (1979). However, the technique should be adapted to the species of salivarian trypanosome and to the mammalian host.

The purpose of this study was to assess the mAECT in goats infected with *T. evansi*. Thus, five adult female Canary goats were inoculated intravenously with at least  $1 \times 10^5$  *T. evansi* isolated from a dromedary camel in the Canaries. The goats were monitored for specific antibodies and parasite detection. The inoculated goats showed a particularly subclinical course of the infection. Parasitemia remained very low but was persistent. For goat blood, the DEAE gel was equilibrated with a phosphate-buffered saline glucose. We conclude that in cases of very low parasitemia in goats, mAECT can be performed when other parasite detection tests failed.

**Keywords:** goat, *Trypanosoma evansi*, blood parasites, Anion Exchange.