

CLASIFICACIÓN POR MÉTODOS MOLECULARES DE CEPAS DE *Trypanosoma* spp AISLADAS EN COLOMBIA Y EVALUACIÓN MORFOMÉTRICA

Cassalett E¹, Vera, V J², Baldrich, R³, Parra, JL⁴

Corpoica; Facultad de Ciencias; Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia

RESUMEN

Mediante el empleo de técnicas de PCR-RFLP se caracterizaron tres cepas de tripanosomas aisladas de bovinos de diferentes regiones de Colombia, a partir de amplificaciones de la región 18S de la subunidad ribosomal del rDNA del parásito. Para el PCR inicial se emplearon los *primers* específicos nF2 y nR3, y sobre el producto obtenido de 756 pb se realizó un PCR semianidado con los *primers* NF2 y NR2 de la misma región. Se obtuvo un producto 650 pb sobre el cual se realizó el análisis de restricción con las enzimas *MspI* y *Eco57I*, lo que permitió clasificar las tres cepas analizadas como *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma theileri*. El estudio morfométrico permitió corroborar diferencias morfológicas entre los parásitos clasificados. Se discute el uso de la técnica de PCR-RFLP como herramienta diagnóstica de la tripanosomosis bovina en Colombia.

Palabras clave: *Trypanosoma* spp, bovino, PCR-RFLP, morfometría, Colombia.

CLASSIFICATION BY MOLECULAR METHODS AND MORPHOMETRIC EVALUATION OF *Trypanosoma* spp STRAINS ISOLATED IN COLOMBIA

ABSTRACT

By means of the use of a PCR-RFLP technique, three strains of isolated tripanosomas were characterized from different regions of Colombia for the amplification of the 18S region of the ribosomal subunit of the rDNA of the parasite, the specific *primers* for the initial PCR, were nF2 and nR3 and on the obtained product of 756 pb, a seminested PCR was carried out with the *primers* NF2 and NR2 of the same region. The obtained product 650 pb was used for the restriction analysis with the enzymes *MspI* and *Eco57I* and allowed to classify the three strains analyzed as *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma theileri*. The morphometric study allowed to corroborate morphological differences among the classified parasites. The article discusses the use of the PCR-RFLPs technique as a diagnostic tool for bovine tripanosomosis in Colombia.

Key words: *Trypanosoma* spp, bovine; PCR-RFLP, morphometric, Colombia.

1 ecassalett@yahoo.es

2 vjveraa@unal.edu.co

3 rbaldrich@latinmail.com

4 jlparrango@telecom.com.co

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por *Trypanosoma* son de gran importancia económica ya que afectan el desarrollo agropecuario en zonas ganaderas, produciendo pérdidas severas en la producción de carne y leche, y alta mortalidad (1). La información disponible en Colombia sobre tripanosomosis es poco consistente debido a que se basa en el diagnóstico clínico y confirmatorio de laboratorio con pruebas de baja sensibilidad, como las técnicas parasitológicas basadas en la observación microscópica de preparaciones de sangre fresca, frotis sanguíneo, microhematocrito (2) o la técnica de "Buffy coat" (3), aspiración de ganglio linfático, al igual que la determinación morfológica del parásito. Estas herramientas no permiten la detección y especiación adecuadas en casos donde existen similitudes entre especies de *Trypanosoma*, o cuando se presentan infecciones crónicas, donde los niveles de parasitemia son bajos (4, 5, 6, 7, 8).

Un diagnóstico adecuado es importante en el estudio de la epidemiología de la tripanosomosis, y es crucial para el desarrollo de tratamientos y de estrategias de prevención y control sobre poblaciones susceptibles ante la enfermedad. Se han desarrollado muchas técnicas de detección de anticuerpos para *Trypanosoma* con relativa buena sensibilidad y especificidad. Dentro de los métodos más utilizados se encuentran la prueba indirecta de anticuerpos inmunofluorescentes (IFAT) (9), la prueba de inmunotripanolisis (10), y una variedad de ensayos de enzimas inmunoabsorbentes como el ELISA (10). La detección del antígeno por medio del ELISA para tripanosomosis descrita por Nantulya *et al.* (11), muestra resultados inconsistentes (12). Las pruebas serológicas presentan mayor sensibilidad que las parasitológicas, pero no distinguen entre infección activa y crónica (13, 7, 14), y no diferencian entre

infecciones mixtas de *T. vivax*, con *T. evansi* y *T. theileri* (15).

Las pruebas que emplean el DNA del parásito proveen mejor sensibilidad y especificidad como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que identifica un número bajo de parásitos (25 parásitos/ml), tanto a nivel del vector como en el hospedero (16, 17).

Existe una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación del parásito, contándose con la hibridización de DNA especie-específicas, que involucran las regiones ITS de genes ribosomales (18), secuencias de genes a nivel de DNA ribosomal (19, 13, 20); DNA satelital (12, 4, 21); PCR combinada con Dot-blot, RAPD y AFLP (22, 23) y PCR-Southern blot, Dot blot, para regiones intergénicas del gene Spliced Leader (16, 7) y amplificando la SsurRNA (24).

Mediante PCR-RFLP de la subunidad ribosomal 18S se logra detectar al *T. Vivax* en bajas cantidades y, además, por poseer un mosaico de secuencias altamente conservadas y secuencias especie-específicas presentes en *locus* multi copia, se puede hacer la diferenciación por especies del parásito (20)

MATERIALES Y MÉTODOS

Multiplicación y purificación de cepas de *Trypanosoma*

Se multiplicaron en ovinos de lana, las cepas de *Trypanosoma vivax* (Dorada, Caldas) y de *Trypanosoma evansi* (San Martín, Meta); la cepa de *Trypanosoma theileri* (Puerto Gaitán, Meta) no fue amplificada. Las cepas provenían del Banco de germoplasma de microorganismos de interés en salud animal - hemoparásitos y ectoparásitos de Corpoica, y fueron inoculadas a una concentración de $2,11 \times 10^5$ parásitos/mm³ de *Trypanosoma vivax* y $13,8 \times 10^3$ parásitos/mm³ de *Trypanosoma evansi* por animal, vía subcutánea e intravenosa. Cuando se obtuvo

una parasitemia de 1×10^5 parásitos/mm³, se colectaron 100 cc de sangre con heparina de cada uno de los animales, y se fraccionó para purificación del *Trypanosoma* crudo en una concentración aproximada de $2,77 \times 10^6$ parásitos por 2 ml (25).

El proceso de purificación se efectuó por la técnica de cromatografía de intercambio iónico (m- AECT) (26), con la cual se separaron los *Trypanosoma* de los glóbulos rojos. Se encontró la fuerza iónica óptima y el pH óptimo (8,0) de la columna de intercambio iónico, teniendo en cuenta los parámetros determinados por Lanham y Godfrey (27).

Morfometría

En las cepas de *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi* recuperados de los ovinos se realizaron extendidos en placa y tinciones con Giemsa, para efectuar determinaciones morfométricas de acuerdo con las claves desarrolladas por Hoare (28), donde se incluyen la longitud y la posición del quinetoplasto, la forma y posición del núcleo y flagelo, y la longitud de la membrana. Se realizaron mediciones en objetivo 100X de inmersión, y se efectuó un factor de corrección que permitió una medida más exacta de los parásitos, de acuerdo con la fórmula $FC = \text{número de rayas escala objetivo} \times \text{objetivo} / \text{número de rayas escala ocular}$.

Las variables resultantes de la morfometría se analizaron bajo la prueba de t Student, mediante la cual se determinó si las observaciones entre las cepas de *T. vivax* y *T. evansi* son estadísticamente diferentes o se comportan de manera similar. Los resultados se generaron a partir de la comparación de los promedios obtenidos por las muestras tomadas en cada población. La hipótesis nula planteada es que no hay diferencias entre las cepas *T. vivax* y *T. evansi*, y la hipótesis alterna indica que existen diferencias estadísticas, es decir, expresiones que hacen diferente el comportamiento de las cepas.

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA de las cepas de *Trypanosoma vivax*, *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma theileri* se utilizó el método de extracción de fenol cloroformo litio. El control negativo consistió en una muestra de sangre bovina parasitada al 6% con *Babesia bigemina*, cedida por los Laboratorios Limor de Colombia, que también fue sometida a extracción con fenol cloroformo litio.

Amplificación de DNA

Con el DNA del *T. vivax*, *T. evansi* y *T. theileri* se realizaron amplificaciones estándar de PCR mezclando reacciones de 25 μ l. Para ello se mezclaron 5 μ l de muestra de DNA, 50nM de KCl, 10nM Tris-HCL (pH 8,3), 1,5 nM MgCl₂, 200 μ M por cada dNTP (desoxirribonucleótidos trifosfatos), 20 pmol de cada *primer* y 0,5 U enzima Taq polimerasa (Promega® M166B).

La mezcla de 25 μ l se ubicó en el termociclador; luego del paso de la denaturalización durante 4 min a 94 °C, cada uno de los 40 ciclos consistió en 60 seg a 94 °C, 90 seg a 58 °C y 120 seg a 72 °C. Un volumen de 5 μ l de cada muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2% por 30 min a 100 V, y teñido con 5 μ l Bromuro de Ethidio.

Se tomó 1 μ l del producto de la primera amplificación, y se adicionaron 24 μ l de la master mix, la cual contiene los mismos componentes y concentraciones de la primera amplificación, excepto el par de *primers*, y el programa de la segunda amplificación se redujo en 25 ciclos. Se tomaron 5 μ l del producto de la segunda amplificación, se sometieron a electroforesis en mini geles de 2% de agarosa por 30 min a 100 V, teñidas con 5 μ l de bromuro de etidio con una escala de 100 bp de DNA para la determinación del tamaño del fragmento, y fotografiadas bajo iluminación UV (20).

Primers utilizados

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los *primers* que se usaron amplificaron una parte del gene rDNA, usando secuencias de la subunidad 18S. La primera amplificación se realizó con el juego de *primers* 18ST nF2 (CAACGATGACACCCATGAATTGGGGA) y 18ST nR3 (TGCGCGACCAATAATTGCAATAC) como primer reverso, y para la segunda amplificación se utilizó como *primers* el 18ST nF2, y el 18ST nR2 (GTGTCTGTTCTCACTGACATTGTAGTG) (20).

Digestión por medio de polimorfismo de fragmentos de restricción

Los productos de las amplificaciones de la PCR semianidada fueron digeridos por las enzimas de restricción MspI y Eco571. Las enzimas utilizaron un buffer Y+/Tango con S-adenosylmethionina de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Gibco, UK) usando 10U/ μg de DNA (0,6 U/ μl de producto de PCR) sobre 6 μl de DNA amplificado en un volumen total de 15 μl . La reacción se dejó toda la noche en baño de María a 37 °C. Pasado este tiempo, 8 μl de la muestra restringida se mezcló con una carga de 2 μl de buffer, para posteriormente ser transferida al gel de agarosa al 2,5% con una escala de 100 bp de DNA para la determinación del tamaño de los fragmentos. Los fragmentos de DNA fueron posteriormente separados por electroforesis horizontal en buffer TAE 1X a 100 V por 1,5 horas. El gel se tiñó usando SYBRGreen (SYBR Safe Invitrogen RS33102 1000X) con el fin de observar las digestiones respectivas de las cepas de *T. vivax*, *T. evansi* y *T. theileri*.

RESULTADOS

La evaluación morfométrica corroboró que el *T. vivax* es un parásito con mayor

longitud (20-25 μm) que el *T. evansi* (18-19 μm), aunque el flagelo libre de este último siempre fue mayor (7-9 μm), al igual que el diámetro de su núcleo. Así mismo, se observó que el diámetro del núcleo del *T. evansi* fue mayor que el del *T. vivax* pero las distancias del núcleo con el extremo posterior y con el quinetoplasto siempre fueron mayores en el *T. vivax*; en ambos parásitos la posición del núcleo fue central, al igual que la del quinetoplasto.

Con el análisis estadístico de las diferentes medidas morfométricas de 100 parásitos de *T. vivax* (50) y *T. evansi* (50), por medio de la prueba de Student, se confirmó que la especie de *T. vivax* es de mayor tamaño que la *T. evansi* tal y como lo reportan estudios previos de estas especies en Suramérica (29, 30, 31).

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de PCR sobre la región de Ssu-rDNA muestran que la PCR semianidada es de mayor sensibilidad, de acuerdo con trabajos previos (7, 18), y se observa claramente que el par de *primers* utilizado (20) es muy específico para el género *Trypanosoma* mostrando amplificados de 756 pb (Gen Bank™) (20), tanto para el *T. vivax*, como para el *T. evansi* y *T. theileri*. No se presentaron amplificados cuando los *primers* fueron expuestos al DNA de *Babesia bigemina*, el cual fue utilizado como control negativo (figura 1).

Con el segundo par de *primers* (18ST nF2 y 18ST nR2), en el PCR semianidado se obtuvieron productos de amplificación con un peso molecular un poco menor que en la primera de 650 pb; la región amplificada abarca un área polimórfica del locus 18S, donde las enzimas de restricción empleadas cortan a diferente altura de acuerdo con la especie de parásito, permitiendo la diferenciación entre especies de *Trypanosoma* (figura 2) (20).

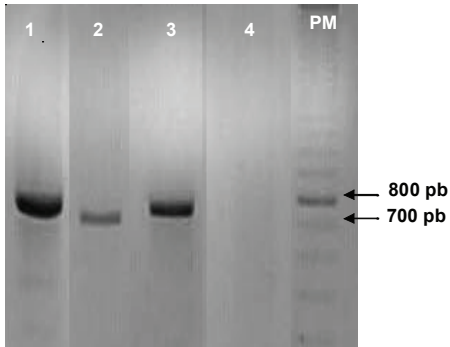


Figura 1. Primera amplificación de la PCR usando los primers 18ST nF2 y 18ST nR3 para el DNA de tripanosomas muestras del banco de germoplasma de Corpoica. *T. evansi* (línea 1); *T. theileri* (línea 2); *T. vivax* (línea 3); *B. bigemina* (línea 4). Marcador de peso de 100 pb DNA.

Los dos pares de primers utilizados en la PCR (20), mostraron una gran homología entre las especies de *Trypanosoma*, pero la diferenciación importante se presentó con la utilización de las enzimas de restricción *MspI* y *Eco57I*, las cuales mostraron perfiles que permitieron una diferenciación entre especies *Trypanosoma*, de gran importancia para el manejo de tripanosomosis en la explotación bovina.

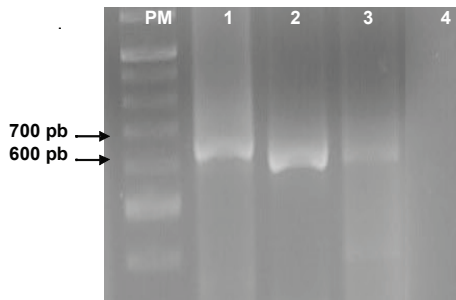


Figura 2. Resultados de la amplificación semi-anidada usando los primers 18ST nF2 y 18ST nR2. *T. evansi* (línea 1); *T. theileri* (línea 2); *T. vivax* (línea 3); *B. bigemina* (línea 4). Marcador de peso de 100 pb.

La técnica de RFLP provee una clara diferenciación entre varios perfiles en caso de infecciones mixtas, aun cuando se encuentre

presente el *T. vivax*, el cual se diferencia muy bien de otras especies como el *T. theileri* (figura 3).

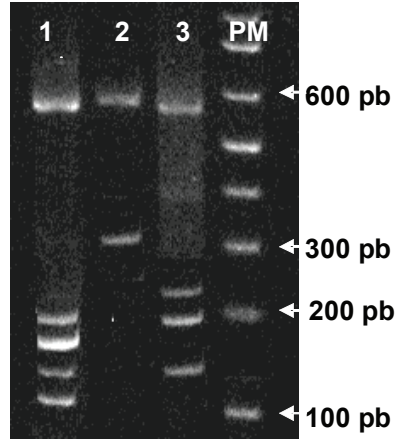


Figura 3. Análisis de las enzimas de restricción RFLP usando *MspI* y *Eco57I*. *T. evansi* (línea 1); *T. theileri* (línea 2); *T. vivax* (línea 3). Marcador de peso de 1Kb plus.

DISCUSIÓN

El presente trabajo se constituye en la primera investigación que se realiza en Colombia sobre tripanosomosis empleando PCR-RFLP, que permite determinar el género y la especie de tripanosomas aislados en Colombia, con metodologías ya empleadas por otros investigadores (18, 7, 32, 33, 34, 35, 36), y por tanto, permitirá al futuro realizar estudios epidemiológicos de la tripanosomosis en nuestro país.

La detección por PCR-RFLP del *Trypanosoma* permite identificar animales aparentemente sanos pero portadores del parásito, y que no son detectables por métodos convencionales de diagnóstico parasitológico, al igual que en periodos de latencia donde los niveles de parasitemia son bajos como sucede en infecciones crónicas o luego de ataques agudos de la enfermedad, situaciones muy comunes en poblaciones bovinas expuestas, que son de difícil diagnóstico con las pruebas parasitológicas clásicas de campo (16).

Se estima que la capacidad de diferenciación entre especies de *Trypanosoma* permitirá un adecuado manejo epidemiológico del problema, pues las medidas de prevención y control que se tomen dependerán de la especie actuante (1, 37, 38, 7).

Aunque el PCR-RFLP es una técnica de alta sensibilidad, algunos autores han tenido dificultad en establecer diferencias entre especies cuando han amplificado las regiones ITS1 y Ssu del rDNA (18, 33, 34, 35, 36), logrando una mayor sensibilidad en establecer la presencia del parásito mas no en conocer la especie. Con la combinación de los *primers* 18ST nF2 y 18ST nR2 que amplifican la región Ssu del rDNA (20), y de las enzimas *MspI* y *Eco57I* así mismo, empleadas en el presente trabajo, se pueden detectar diversas especies de *Trypanosoma* que simultáneamente estén afectando a un hospedero (infecciones mixtas).

La determinación morfológica y diferenciación entre *T. vivax* y *T. evansi* coincidió con los resultados obtenidos por PCR-RFLP lo cual concuerda con trabajos de diferentes investigadores (7, 16, 29, 30, 31, 39, 40). Las dos especies de *Trypanosoma* colombianos se encuentran en los rangos morfométricos determinados para especies suramericanas y africanas, como lo corroboran autores como Prichard y Tait (13) y Figueroa y Buening (19), siendo un método epidemiológico aún empleado para la determinación de relaciones filogenéticas entre tripanosomas a nivel mundial.

Estadísticamente se corroboraron diferencias altamente significativas ($p < 0,05$) entre las cepas de *T. vivax* y de *T. evansi*, en las variables longitud total, longitud del flagelo, diámetro del núcleo y distancia del núcleo al extremo posterior del parásito, con diversos estudios realizados a nivel mundial (7, 16, 29, 30, 31, 39).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La amplificación por PCR de la región Ssu rDNA con *primers* específicos permite identificar al *Trypanosoma* sp (25 *Trypanosoma*/ml de sangre), con una sensibilidad que no se obtiene con los métodos tradicionales de diagnóstico, por tanto se recomienda su aplicación en zonas enzoóticas a la enfermedad.

La prueba de PCR-RFLP, por tener la capacidad de diferenciar especies de *Trypanosoma*, se constituye en una herramienta importante para la elaboración de planes y programas preventivos estatales y de estudio de la enfermedad, en investigaciones epidemiológicas de tripanosomosis en Colombia, donde se involucren vectores y reservorios silvestres, así como estudios longitudinales y de impacto económico de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Otte MJ. La importancia de la tripanosomiasis en la industria ganadera de Córdoba, Colombia. Informe técnico N° 8, Proyecto Colombo-Alemania, ICA-GTZ. Bogotá, 1991.
- Woo PTK. Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human tripanosomiasis and filariasis. *Acta Tropica*. 28:298-303, 1972.
- Murray M, Murray PK, McIntyre WIM. An improved parasitological technique for the diagnosis of African tripanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71:325-326, 1977.
- D'Almeida P, Ndao M, Van Meirvenne N, Geerts S. Diagnostic evaluation of PCR in goats experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Acta Tropica* 66:45-50, 1997.
- Masake RA, Majiwa PAO, Moloo SK, Makau JM, Njuguna JT, Maina M, et al. Sensitive and Specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Experimental Parasitology* 85:193-205, 1997.

6. Morlais I, Ravel S, Grébaud P, Dumas V, Cuny G. New Molecular Marker for *Trypanosoma (Dunotella) vivax* identification. *Acta Tropica* 80:207-213, 2001.
7. Ventura RM, Paiva F, Silva RA, Takeda GF, Buck G.A, Teixeira MM. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp. Parasitol.* 99(1):37-48, 2001.
8. Masake RA, Njuguna JT, Brown CC Majiwa PAO. The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infection in livestock. *Veterinary Parasitology* 105:179-189, 2002.
9. Katende JM, Musoke AJ, Nantulya VM, Goddeeris BM. A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. *Trop. Med, Parasitol.* 38:41-44, 1987.
10. Verloo D, Holland W, My LN, Thanh NG, Tam PT, Goddeeris B, Vercruyse J, Buscher P. Comparison of serological test for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Vet. Parasitol.* 92:87-96, 2000.
11. Nantulya MV, Lindquist KJ. Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle. *Trop. Med. Parasitol.* 40:267-272, 1989.
12. Desquesnes M. Evaluation of a 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 Trop.* 65:139-148, 1997.
13. Prichard R, Tait A. The role of molecular biology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 98:169-194, 2001.
14. Magona JW, Mayende JSP, Olaho-Mukani W, Coleman PG, Jonsson NN, Welburn SC, Eisler MC. A comparative study on the clinical, parasitological and molecular diagnosis of bovine trypanosomosis in Uganda. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 70 (3):213-218, 2003.
15. Jones TW, Dávila AMR. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Trends in Parasitology*, 17 (2):99-101, 2001.
16. Dirie MF, Otte MJ, Thatthi R, Gardiner PR. Comparative studies of *Trypanosoma (Dunotella) vivax* isolates from Colombia. *Parasitology*. 106:21-29, 1993.
17. Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T. Characterization of *Trypanozoon* isolates using a repeated coding sequence and micro-satellite markers. *Molecular and Biochemical Parasitology* 105:185-201, 2000.
18. Desquesnes M, McLaughlin G, Zoungrana A, Dávila AMR Detection and identification of *Trypanosoma* of American livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.* 31:610-614, 2001.
19. Figueroa JV, Buening GM. Nucleic acid probes as a diagnostic method for tick borne hemoparasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 75:72-92, 1995.
20. Geysen D, Delespau V, Geerts S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Veterinary Parasitology* 110:171-180, 2003.
21. Dickin SK, Gibson WC. Hybridisation with a repetitive DNA probe reveals the presence of small chromosome in *Trypanosoma vivax*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33:135-142, 1989.
22. Masiga DK, Smyth A, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. Sensitive detection of Trypanosomes in *Tsetse* flies by DNA amplification. *International Journal of Parasitology* 22 (7):909-918, 1992.
23. Masiga DK, Ndung K, Turner M. An analysis of genetic variability in *Trypanosoma evansi* using Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism (AFLP) and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Mol. Biochem Parasitol.* 42:265-279, 2000.

24. Malele I, Craske L, Knight C, Ferris V, Njiru Z, Hamilton P, Lehane S, Gibson W. The use of specific and generic *primers* to identify trypanosome infections of wild *tsetse* flies in Tanzania by PCR. *Infections, Genetics and Evolution*. Article in Press, 2003.
25. Dalgliesh RJ. Theoretical and practical aspects of freezing parasitic protozoa. *Aust. Vet. J.* 48 (5):233-239, 1972.
26. Lumsden WHR, Kimber CD, Evans DA, Doig SJ. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73:312-317, 1979.
27. Lanham SM, Godfrey DG. Isolation of salivarian Trypanosome from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28 (3):521-534, 1970.
28. Hoare CA. *The Trypanosomes of mammals*. A Zoological Monograph Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh, UK, 1972.
29. Muñoz K, Chávez A. *Trypanosoma evansi* isolate from Capybara (*Hidrochaeris hidrochaeris*). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 96 (7):945-946, 2001.
30. Silva RAMS, Da Silva JA, Schneider RC, De Freitas J, Mesquita DP, Ramírez, L, Dávila AMR, Pereira MEB. Outbreak of Trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of Pantanal, Brazil. *Mems. Inst Oswaldo Cruz.* 91:561-562, 1996.
31. Quispe P, Chavez A, Casas E, Trigueros A, Suárez F. Prevalencia de *Trypanosoma vivax* en bovinos de la Provincia de Coronel Portillo, Ucayali. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 14(2):161-165, 2003.
32. Ventura RM, Takeda GF, Silva RAMS, Nunes VLB, Buck GA, Teixeira MMG. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species –specific diagnosis. *International Journal of Parasitology* 32:53-63, 2002.
33. Delespaux V, Ayrat F, Geysen D, Geerts S. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification: applicability for the diagnosis of mixed infections with different trypanosome species in cattle. *Vet. Parasitol.* 117:185-193, 2003.
34. Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Davila AM. The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol. Res.* 95 (3):186-192, 2005.
35. Thekisoe OM, Inoue N, Kuboki N, Tuntasuvan D, Bunnoy W, Borisutsuwan S, Igarashi I, Sugimoto C. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. *Vet. Parasitol.* 130 (3-4):327-330, 2005 .
36. Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (*Haemadipsidae*). *Int. J. Parasitol.* 35(4):431- 443, 2005.
37. Villar C, García O, Hortúa H. Estudio epidemiológico del *Trypanosoma evansi* en el municipio de Cravo Norte (Arauca). *Revista Achagua* 1 (3):37-39, 1994.
38. Villar C, Sánchez VH Parra JL. Estrategias para el control de parásitos en bovinos del departamento del Guaviare. *Boletín Técnico* 22. Corpoica, 2000.
39. Ramírez L, Dávila AMR, Victório AM, Silva Rams, Trajano V, Jamsen AM. Measurements of *Trypanosoma evansi* from the Pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rios de Janeiro* 92 (4):483-484, 1997.
40. Dávila, AMR, Ramírez L, Silva Rams. *Trypanosoma vivax* in the Americas: morphometry and host range. *Revue Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 51 (1):29-35, 1998.