



UNIVERSIDAD DEL ZULIA  
**REVISTA CIENTÍFICA**

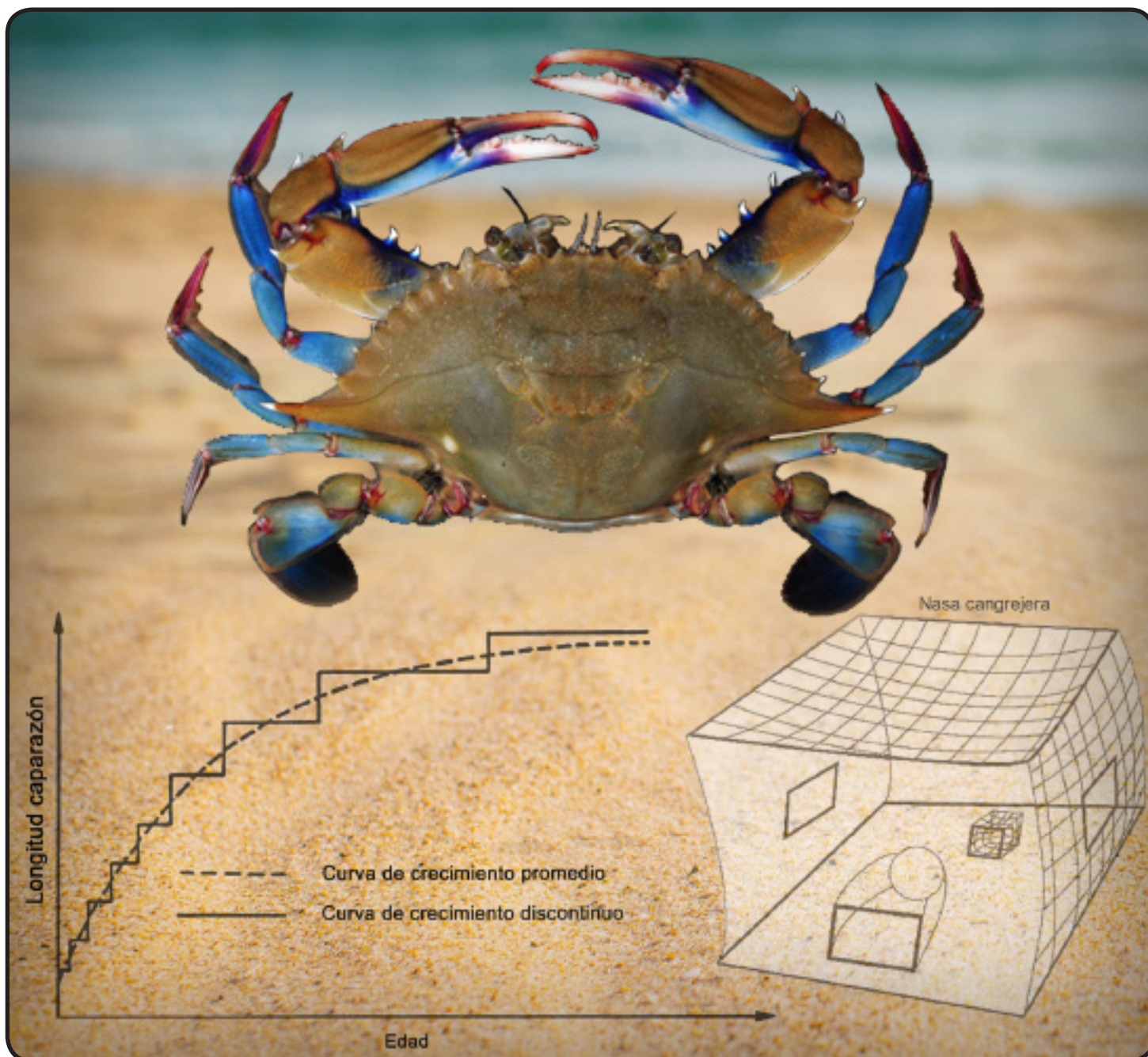


FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN

Revista Electrónica:  
Depósito Legal: ppi 201502ZU4665 // ISSN electrónico: 2477-944X

Revista Impresa:  
Depósito Legal: pp 199102ZU46 / ISSN 0798-2259

MARACAIBO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA



# REVISTA CIENTÍFICA

Fundada en 1990

**Universidad del Zulia**  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

Vol. XXIX (3)  
Mayo - Junio, 2019

**MIEMBROS FUNDADORES**  
José Faría R. (+)  
Mario Pérez B.  
Manuel Alvarado M.

**DIRECTOR FUNDADOR**  
Rafael César Reátegui Cárdenas (+)

**EDITOR JEFE**  
Mario Pérez Barrientos

**EDITOR ASOCIADO**  
Edison Pascal-Bello

**COMITÉ EDITOR**  
María Piñero  
Disney Pino  
María Elena Peña  
Armando Quintero  
Roger Ramírez

**SECRETARIA EJECUTIVA**  
Marilyn Del V. Añez Davila

**DISEÑO GRÁFICO**  
Alonso Eleazar Flores Rondón

La edición de esta revista ha sido auspiciada por el Vicerrectorado Académico LUZ, el Sistema de Servicios Bibliotecarios y de Información (Serbiluz) y Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de LUZ (CONDES)

SE AGRADECE CANJE  
EXCHANGE DESIRED

**DIRECCIÓN:**  
**Revista Científica**  
Universidad del Zulia,  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Núcleo Agropecuario Ciudad Universitaria  
Apdo. 15252, Maracaibo 4005-A  
Estado Zulia-Venezuela  
Telf.-Fax: 58-261-4126158  
E-mail: [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com)  
<http://www.fcv.luz.edu.ve>

<http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica>

El índice Acumulado Anual aparecerá en el último número de cada volumen.  
No. 6 Noviembre - Diciembre

Esta revista fue editada en formato digital y publicada en Diciembre de 2018, por **La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia** Maracaibo - Venezuela.



## Autoridades Universitarias

Jorge Palencia..... Rector  
Judith Aular de Durán..... Vicerrectora Académica  
María Artiga..... Vicerrector Administrativo  
Marlene Primera..... Secretaria

## Autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias

José Manuel Rodríguez..... Decano  
Wilfido Bríñez..... Director Escuela  
José Atilio Aranguren..... Director División Postgrado  
Nidia Rojas..... Directora División Investigación  
Julio Boscán..... Director División Extensión  
Gustavo Prato..... Directora Policlínica Veterinaria  
Decio González..... Secretario Docente  
Jorge Rubio..... Coordinador del Núcleo Rural  
Alexander Boscán..... Coordinador Núcleo Grano de Oro

## Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico

Gilberto Vizcaíno..... Coordinador-Secretario

### Portada:

**PARÁMETROS POBLACIONALES DEL CANGREJO**  
*Callinectes danae* (DECAPODA: PORTUNIDAE)  
**DE LA ISLETA, ISLA DE MARGARITA, VENEZUELA**

(Págs. 221 - 230)

*La revista no se hace responsable de los conceptos emitidos por sus autores*

**Prohibida la reproducción total o parcial del contenido de esta Revista**

© REVISTA CIENTÍFICA, 2018  
© FCV, Universidad del Zulia  
Revista impresa  
ISSN 0798-2259  
Depósito Legal: pp 199102ZU46  
Revista electrónica  
Depósito Legal: ppi 201502ZU4665  
ISSN electrónico: 2477-944X

[www.luz.edu.ve](http://www.luz.edu.ve)



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN

## REVISTA CIENTÍFICA

**REVISTA INTERNACIONAL ARBITRADA DEDICADA A LA DIVULGACIÓN  
DE INVESTIGACIONES ORIGINALES EN EL ÁREA AGROPECUARIA**

Vol. XXIX (3) Mayo - Junio, 2019  
MARACAIBO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Indizada y registrada en:  
**Institute for Scientific Information (ISI):** Research Alert® y Focus on:  
Veterinary Science & Medicine™

**Science Citation Index (SCIExpanded)**

**Revicyhluz. Revistas Científicas y Humanísticas de LUZ**

(URL: <http://produccioncientificaluz.org/revicyhluz/>)

**SWETS Blackwell Database**

**ELSEVIER Extended Science Direct Navigator Database**

**Ulrich's Periodicals International Directory**

**Veterinary Bulletin**

**Index Veterinarius**

**CAB Abstracts Database - UK**

**Base de Datos Wildlife & Ecology Studies Worldwide (EBSCO Publishing Inc.)**

**Base de Datos de Revistas Venezolanas de Ciencia y Tecnología (REVENCYT)**

**Registro de Publicaciones Científicas y Tecnológicas Venezolanas**

**del FONACIT - MCT**

**Asociación de Editores de Revistas Biomédicas Venezolanas (ASEREME)**

**Asociación Venezolana de Editores de Publicaciones de las Ciencias**

**del Agro (AVEPAGRO)**

**LATINDEX**

**Base de Datos "Informe Académico" (Thomson-Gale) USA**

**Base de Datos LILACS (Literatura Latinoamericana de Ciencias de la Salud)**

**Base de Datos LIVECS (Literatura Venezolana en Ciencias de la Salud)**

**Scielo Venezuela ([www.scielo.org.ve](http://www.scielo.org.ve))**

**Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal**

**(Redalyc): <http://redalyc.uaemex.mx/>**

**Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC Data Bases), [siicsalud.](http://siicsalud.com)**

**[www.siicsalud.com](http://www.siicsalud.com)**

**Citefactor Journals [Citefactor.org](http://Citefactor.org). Director Indexing of International Research Journals**

REVISTA CIENTÍFICA, es una revista internacional que representa el órgano científico de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. La misión es publicar la mejor literatura científica tropical y subtropical relacionada a las áreas de las ciencias veterinarias, producción animal, salud pública y tecnología de alimentos de origen animal, así como, literatura científica generada en zonas templadas, pero con aplicabilidad tropical. Todos los trabajos recibidos deben seguir el formato que se presenta en las instrucciones para autores y pasar por un proceso de arbitraje anónimo.

La Revista edita 6 números anual y su periodicidad es bimestral.

*Toda correspondencia debe ser enviada a:*  
*Editor Jefe REVISTA CIENTÍFICA*  
*Facultad de Ciencias Veterinarias*  
*Universidad del Zulia. Apartado 15252.*  
*Maracaibo 4005-A, Estado Zulia, Venezuela*  
*Teléfono-Fax: (58-0261) 4126158.*  
*<http://produccioncientifica.luz.edu.ve>*  
*<http://www.fcv.luz.edu.ve>*

REVISTA CIENTÍFICA, is an international journal representing the scientific organ of the Faculty of Veterinary Sciences at the University of Zulia, Maracaibo, Zulia State, Venezuela. The aim is publishing the best tropical and subtropical scientific literature related to the fields of veterinary clinical sciences, animal production, public health, food sciences and technology of animal products as well as scientific literature generated in temperate zones but with tropical applicability. All the submitted manuscripts must follow the established editorial guidelines and go through an anonymous peer review process.

REVISTA CIENTÍFICA is published every two months.

*All mail must be sent to:*  
*Editor in Chief REVISTA CIENTÍFICA*  
*Facultad de Ciencias Veterinarias*  
*Universidad del Zulia. Apartado 15252.*  
*Maracaibo 4005-A, Estado Zulia, Venezuela*  
*Teléfono-Fax: (58-0261) 4126158.*  
*<http://produccioncientifica.luz.edu.ve>*  
*<http://www.fcv.luz.edu.ve>*

## COMITÉ DE ASESORES

- Pedro M. Aso Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela
- Alfredo Coronado Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela
- Roy D. Meléndez Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela
- Héctor Soto Castellanos Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez, Caracas, Venezuela
- Antonio Bretaña Nacional Experimental Simón Rodríguez, Caracas, Venezuela
- Marc Desquesnes CIRAD-EMVT, Burkina Faso, West Africa
- Edmundo Grisard Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil
- Alexis Rodríguez Acosta Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
- Elías Sogbe Martínís Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela
- Andrés Soyano Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Los Teques, Venezuela
- William Isea Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela
- Enrique Márquez Salas Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela
- Nelson Huerta Leidenz Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela
- Eleazar Soto Belloso Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela
- José Luis Ramírez Universidad de Oriente, Maturín, Venezuela



República Bolivariana de Venezuela  
**Universidad del Zulia**  
 Consejo Universitario



Con el voto favorable del Consejo de la Orden y en virtud de lo establecido en el reglamento respectivo, confiere la

**Orden al Mérito Universitario**  
**Dr. Jesús Enrique Lossada**

en su Única Clase a la

**Revista Científica de la Facultad de Veterinaria**

Por su incansable labor al servicio de la divulgación del conocimiento científico producido desde la academia, dando cabida no sólo al producto intelectual generado desde la Facultad de Veterinaria sino también del interior y exterior del país, dejando así testimonio del prestigio y éxito de toda la comunidad científica universitaria y del funcionamiento y crecimiento generado desde la Institución.

Revisado,

Dra. Marlene Peimora Galus  
 Secretaria



Dr. Jorge Palencia Piña  
 Rector-Presidente

Maracaibo, 1 de octubre de 2012



República Bolivariana de Venezuela  
**Universidad del Zulia**  
 Consejo Universitario



**Orden al Mérito Universitario**  
**Dr. Francisco Ochoa**

Que en su **Única Clase** se le confiere a la  
**Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias**

Por decisión del Consejo Universitario y cumplidos los requisitos establecidos en el respectivo Reglamento, cuyos Artículos 1º y 2º indican lo siguiente:

**Artículo 1:** La Orden al Mérito Universitario Dr. Francisco Ochoa es la máxima distinción honorífica que confiere la Universidad del Zulia a las personas e instituciones por los excepcionales méritos en sus labores científicas, culturales y profesionales.

**Artículo 2:** La Orden al Mérito Universitario Dr. Francisco Ochoa se propone identificar, ponderar, valorar y premiar:

- a.- Aquellas personas e instituciones que se hayan destacada por acciones filantrópicas, científicas, humanísticas, profesionales, sociales, políticas o de cualquier naturaleza que le hayan dado prestigio a la Universidad del Zulia.
- b.- La labor realizada por insignes científicos, tratadistas, estudistas, por ser referencia de particular notoriedad e influencia en los programas curriculares y de investigación, por los aportes en el desarrollo y establecimiento de nuevos enfoques en la ciencia, educación y cultura.-

En Maracaibo al primer día del mes de octubre de dos mil once. Años: 201º y 152º.-

Dr. Jorge Valencia Piña  
 Rector



Dra. Marlene Primera Galuz  
 Secretaria

# REVISTA CIENTÍFICA

## REVISTA INTERNACIONAL ARBITRADA DEDICADA A LA DIVULGACIÓN DE INVESTIGACIONES ORIGINALES EN EL ÁREA AGROPECUARIA

Vol.XXIX (3)

Mayo - Julio, 2019

	Pág.
<b>EDITORIAL</b>	163
<b>PRODUCCIÓN ANIMAL/ANIMAL PRODUCTION</b>	
EFEECTO DEL ENSILAJE DE AVENA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE VACAS LACTANTES EN NARIÑO-COLOMBIA <b>EFFECT OF OAT SILAGE ON LACTANTING COW IN NARIÑO-COLOMBIA</b> Juan Leonardo Cardona-Iglesias <sup>1*</sup> , Edwin Castro-Rincón <sup>2</sup> , Martín Valenzuela-Chiran <sup>3</sup> , Filadelfo Hernández-Oviedo <sup>4</sup> y Yesid Avellaneda-Avellaneda <sup>5</sup> .....	165
GENETIC DIVERSITY AMONG LOCAL QUAIL USING RAPD-DNA MARKER <b>DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE CODORNICES LOCALES USANDO MARCADORES DNA-RAPD</b> Lajan Salahaldin Ahmed* and Yousif Mohamed Salih AL-Barzinji.....	178
TIPOLOGÍAS Y ANÁLISIS GEOESPACIAL DE LA PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EL MUNICIPIO LAS TUNAS, CUBA <b>TYPOGRAPHY AND GEOSPATIAL ANALYSIS THE SHEEP PRODUCTION IN THE MUNICIPALITY THE TUNAS, CUBA</b> Javier Antonio Herrera-Toscano <sup>1</sup> y Oscar Carmenate-Figueroa <sup>2</sup> .....	186
<b>MEDICINA VETERINARIA/VETERINARY MEDICINE</b>	
SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN EL ALTIPLANO BOYACENSE, COLOMBIA-SURAMÉRICA <b>SEROPREVALENCE OF BOVINE BRUCELLOSIS IN THE BOYACENSE HIGHLANDS, COLOMBIA - SOUTH AMERICA</b> Roy José Andrade-Becerra <sup>1*</sup> , Julio Cesar Vargas-Abella <sup>2</sup> , y Luis Edgar Tarazona-Manrique <sup>3</sup> .....	192
<b>FAUNA SILVESTRE / WILD LIFE</b>	
PREVALENCIA DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES EN <i>Penaeus vannamei</i> FARMED OF SINALOA, MEXICO <b>PREVALENCIA DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES EN <i>Penaeus vannamei</i> DE CULTIVO EN SINALOA, MEXICO</b> María Soledad Morales-Covarrubias <sup>1*</sup> , Noemí García-Aguilar <sup>1</sup> , María del Carmen Bolan-Mejía <sup>1</sup> and Oscar Guillermo Zamora-García <sup>2</sup> .....	198
BIODIVERSITY OF ACTIVE TOXINS AND PROTEOMIC ANALYSIS OF LANSBERG'S MAPANARE ( <i>Porthidium lansbergii hutmanni</i> ) VENOM SNAKE AND ITS IMPACT ON ENVENOMING <b>DIVERSIDAD BIOQUÍMICA DE LAS TOXINAS ACTIVAS Y EL ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL VENENO DE LA SERPIENTE MAPANARE DE LANSBERG (<i>Porthidium lansbergii hutmanni</i>) y su IMPACTO EN EL ENVENENAMIENTO</b> María Eugenia Pineda <sup>1</sup> , Alba Marlene Vargas <sup>1</sup> and Alexis Rodríguez-Acosta <sup>2*</sup> .....	207

PARÁMETROS POBLACIONALES DEL CANGREJO *Callinectes danae* (DECAPODA: PORTUNIDAE) DE LA ISLETA, ISLA DE MARGARITA; VENEZUELA  
**POPULATION PARAMETERS OF THE CRAB *Callinectes danae* (DECAPODA: PORTUNIDAE) FROM LA ISLETA, MARGARITA ISLAND, VENEZUELA**

Nora Eslava<sup>1</sup>, Leo Walter González<sup>1</sup>, Francisco Guevara<sup>1</sup> y Idar Quijada <sup>2</sup>..... 221

*SALUD PÚBLICA VETERINARIA / VETERINARY PUBLIC HEALTH*

FACTORES ECOEPIDEMIOLOGICOS RELACIONADOS CON LA SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* EN HABITANTES AUTÓCTONOS DE COMUNIDADES DE ISLA MARGARITA, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA.

**ECOEPIDEMIOLOGICAL FACTORS RELATED TO SEROPREVALENCE OF ANTI-*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* ANTIBODIES IN AUTOCHTHONOUS INHABITANTS OF COMMUNITIES FROM MARGARITA ISLAND, NUEVA ESPARTA STATE, VENEZUELA.**

Antonio Morocoima<sup>1</sup>, Oriana Carías-Sojo<sup>1</sup>, Elizabeth Ferrer<sup>2</sup>, Leonardo De Sousa<sup>3</sup> y Servio Urdaneta-Morales <sup>4</sup>..... 231



## EDITORIAL

*La ciencia es un sendero extraordinario que los investigadores tenemos la dicha de transitar. En ese camino conseguimos muchos obstáculos pero con audacia y cúmulo de experiencias vamos rebasando, de esta manera, luchando y perseverando alcanzamos los frutos de nuestros esfuerzos, logrando la preparación y formación cada día más.*

*A través de esta extraordinaria y maravillosa senda que es la ciencia, hemos teorizado como se formo y evoluciona el universo, la vida, hemos probado nuevos fármacos, descubierto nuevas especies, entre otras tantas cosas que han llenado nuestro planeta de nueva información útil para el desarrollo de la humanidad.*

*Particularmente desde niño sentí fascinación por la ciencia, el descubrimiento de las cosas, las estrellas y los animales eran y siguen siendo mi mayor pasión. Siendo joven esta admiración me llevo a ingresar a la facultad de Ciencias de La Universidad del Zulia (LUZ), donde tuve la oportunidad de realizar actividades de investigación desde los primeros semestres de la carrera de Biología.*

*Hoy en día ser científico en Venezuela es una labor ardua, ya que los meritos no son reconocidos, sin embargo, he sido testigo de la labor incansable de muchos colegas investigadores de diferentes instituciones de educación e investigación en el país para no declinar.*

*De esta realidad no escapa nuestra amada institución, LUZ la cual ha sido asfixiada desde el punto de vista presupuestario, las directrices y lineamientos que actualmente se siguen en términos de investigación y logística se ven trastocadas, aunados a la fuga de talentos. Esto ha conllevado que la producción de los investigadores de la Revista Científica Veterinaria se vea afectada a mediano plazo. No obstante, sigue en pie con sus puertas abiertas, con un personal calificado y presto a atender a la comunidad científica regional, nacional e internacional. En una constante búsqueda de investigadores a pesar de los contratiempos.*

*Por eso es meritorio hacer un reconocimiento a las autoridades universitarias, en especial a la directiva de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), por seguir desafiando las adversidades de estos tiempos duros de nuestra nación y trabajar arduamente por brindar excelencia académica.*

*Es pertinente de igual manera elogiar el trabajo realizado por el personal docente y administrativo que labora en la Revista Científica de la FCV de LUZ, ya que no es sencillo llevar una revista de esta magnitud en la imperiosa situación país actual, sin embargo, desde estos espacios se sigue dando lo mejor de cada uno para que este importante producto intelectual continúe ofreciendo conocimientos a los diferentes ámbitos del*

*saber científico, a la comunidad de investigadores, estudiantes, agroproductores entre otros.*

*No queda más que invocar, que sea el Dios creador del universo que nos bendiga y nos de fuerza para seguir en nuestras labores inherentes al saber científico.*

*Bendiciones para todos.*

**Dr. Edison Pascal-Bello**

*Editor Asociado de la Revista Científica Veterinaria FCV-LUZ*

# EFECTO DEL ENSILAJE DE AVENA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE VACAS LACTANTES EN NARIÑO-COLOMBIA

## Effect Of Oat Silage On Lactating Cow In Nariño-Colombia

Juan Leonardo Cardona – Iglesias<sup>1\*</sup>, Edwin Castro – Rincón<sup>2</sup>, Martín Valenzuela – Chiran<sup>3</sup>,  
Filadelfo Hernández – Oviedo<sup>4</sup> y Yesid Avellaneda – Avellaneda<sup>5</sup>.

Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria Agrosavia Centro de Investigación Obonuco Km 5 Vía Pasto Obonuco, Nariño, Colombia<sup>1</sup> Investigador Master, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Centro de Investigación Obonuco, Pasto, Colombia. jlcardona@agrosavia.co<sup>2</sup> Investigador Ph.D, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Centro de Investigación. Obonuco, Pasto, Colombia. Profesional de apoyo a la investigación, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Centro de Investigación Obonuco, Pasto, Colombia. Profesional de apoyo a la investigación, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Centro de Investigación Obonuco, Pasto, Colombia. Correo: Investigador Master, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), Centro de Investigación. Tibaitata, Bogotá, Colombia. Convenio Especial de Cooperación de Ciencia Tecnología e Innovación N0. 882 2015 Entre el Departamento de Nariño, y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Agrosavia. Financiado con recursos del Sistema General de Regalías SGR Asignados al Departamento de Nariño y recursos propios de AGROSAVIA

### RESUMEN

El experimento se realizó en el Centro de Investigación Obonuco de Agrosavia (2 réplicas), Pasto (Nariño-Colombia), donde se evaluó la respuesta productiva y perfil metabólico de vacas lactantes, de acuerdo al suministro de ensilaje de avena (*Avena-sativa-L*). Se utilizaron seis vacas primer parto F1 kiwi-cross x Holstein, durante el primer tercio de lactancia, en pastoreo, en un cuadrado latino replicado 3x3, el ensilaje se suministró en tres tratamientos TTOS: T1=0; T2=0,8 y T3=1,4% según peso vivo (PV) del animal. Cada periodo evaluado comprendió 12 días (d), 5 fueron de acostumbamiento y 7 de medición; la leche se midió durante los 12 d y los últimos 3 d se recolectaron en ordeño muestras de leche/animal, se evaluó: producción de leche litros (L)/día (d) (PL); %proteína (P), %grasa (G), %solidos totales (ST) y nitrógeno ureico en leche (MUN miligramos (mg) / decilitro (dL)). El d 12 se tomó muestra de sangre, vía punción coccígea determinando en suero indicadores de perfil metabólico (Glucosa-Colesterol-BUM-milimol -mmol/L), La información se procesó en el software R-Project, con análisis de varianza y pruebas de comparación de medias (Tukey<0,05). Se presentó efecto significativo en el consumo de materia seca (MS) total (P<0,05) siendo mayor para T3 (15,14 kilogramos (kg)/MS/d). La variable producción de leche (PL), fue mayor (P<0,05) para los TTOS que incluyeron el ensilaje (T2:10,01; T3:10,5 L/vaca/d) vs 9,36 L/vaca/d de los animales sin suplementar. Las demás variables productivas y de perfil metabólico no presentaron diferencia (P>0,05) entre TTOS. Se concluye que la suplementación con ensilaje de *Avena sativa* en vacas lecheras Kiwi cross x Holstein puede ser una estrategia nutricional para aumentar la producción de leche en épocas de escases de pasturas, en el trópico alto andino de Nariño, Colombia.

**Palabras clave:** Cereales forrajeros; suplementación estratégica; producción de leche

### ABSTRACT

This experiment was carried out in the Obonuco Research Center of Agrosavia (2 replication), Pasto (Nariño-Colombia). The productive response and metabolic profile of lactating cows were evaluated according to the supply of oat silage (*Avena-sativa-L*). Six first calving cows F1 kiwi-cross x Holstein, during the third lactation period, were used; in grazing, in a 3x3 replicated Latin square, silage was supplied in three treatments TTOS: T1=0, T2=0.8 and T3=1.4% according to live weight (LW) of the animal. Each period consisted of 12 days (d), 5 d for rest and 7 d for measurement, milk was measured during the 12 d and the last 3 d were collected in milking milk/animal samples, it was evaluated: milk production liters (L)/day (d) (PL); %protein (P), %fat (G), %total solids (ST) and urea nitrogen in milk (MUN milligrams (mg) / delicters (dL)). On d 12, blood samples were taken from coccygeal puncture, determining in serum indicators of metabolic profile (Glucose-Cholesterol-BUM-millimol (mmol)/L)). The information was processed with the R-Project software, with variance analysis and mean comparison tests (Tukey<0,05). There was a significant effect on total dry matter intake (P<0,05) being higher for T3 (15,14 kilograms (kg)/DM/d). The milk production variable (PL) was higher (P<0,05) for the TTOS that included silage (T2:10,01; T3:10,5 L/cow/d) vs 9,36 L/cow/d of the animals without supplement. The other productive and metabolic profile variables did not present a statistical differences (P>0,05) between TTOS. It is concluded that supplementation with *Sativa oats* silage in Kiwi cross x Holstein dairy cows may be a nutritional strategy to increase milk production during pastures shortage in the high Andean tropics of Nariño, Colombia.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia, los sistemas de producción de leche se establecen básicamente en el trópico de altura, entre los 1.800 y 3.000 metros sobre el nivel del mar (msnm) [53]. En dichos sistemas ganaderos se presentan a menudo dificultades en la alimentación animal, debido entre otros, a la fluctuación de cambios ambientales. En Colombia son marcados los periodos de épocas de lluvia e intensos veranos, esta estacionalidad climática afecta directamente la oferta de forraje y de nutrientes en los sistemas ganaderos [64]. Los efectos de las variaciones climáticas y la llamada “estacionalidad forrajera” impactan negativamente la producción de leche, el crecimiento y la carga animal [48].

Además de lo anterior, otra limitante para mantener una oferta adecuada de consumo de materia seca (CMS) y tratar de aumentar los parámetros productivos en los sistemas ganaderos de trópico alto colombiano es el manejo deficiente de las praderas [12]. Cuando no se tiene un manejo adecuado de las pasturas, disminuye su oferta y su calidad nutricional es baja, lo que hace que esto sea más pronunciado en épocas de invierno o sequía [18,65]. Es por eso que se hace necesario implementar estrategias de conservación de forrajes mediante técnicas como el ensilaje. El ensilaje conserva la calidad nutricional de los forrajes, disminuye los niveles de metabolitos secundarios, reduce los riesgos de contaminación y garantiza oferta de alimento en épocas de escases de pasturas [5]. La utilización de ensilajes además, reemplaza total o parcialmente el uso de alimentos balanceados, lo que disminuye los costos de producción y promueve el uso de otras fuentes alimenticias fibrosas menos costosas para el productor [54].

Los cereales forrajeros como la avena (*Avena sativa* L) se han constituido en cultivos muy importantes en muchos de los sistemas ganaderos del trópico alto andino; en el cultivo de la avena se reporta mayor rendimiento de materia seca (MS) por hectárea (ha), en comparación con otros cereales forrajeros [1, 61]. Además tiene amplio rango de adaptación pudiéndose establecer desde zonas altas, frías y lluviosas, hasta ambientes secos [31]. El ensilaje de avena forrajera se caracteriza por aportes significativos de nutrientes al animal, encontrándose para la zona alto andina de Colombia, valores promedios de MS de 28%, proteína cruda (%PC) 11% y de Energía Mcal ED/kilogramos (kg) MS hasta de 2,28 [5].

La suplementación con ensilajes de avena en vacas lecheras (*Bos taurus*) en pastoreo produce respuestas variables sobre la producción y composición de la leche. Se debe tener en cuenta que, sobre el rendimiento animal inciden de manera directa factores tales como: la edad de corte del material forrajero, la inoculación o uso de aditivos, el tamaño de partícula, el proceso de almacenamiento y el nivel de oferta de ensilaje entre otros [52,57,58]. Según lo anterior, la productividad animal estaría influenciada sobre todo por aspectos de calidad nutricional del

ensilaje y sería este factor el que más influenciaría la producción y la calidad composicional de la leche [67].

Promover el uso de ensilajes con cereales forrajeros adaptados a la zona alto andina de Colombia, como la avena forrajera, es primordial como estrategia de suplementación animal en épocas de escases de pasturas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el rendimiento productivo de vacas lactantes con la inclusión de diferentes niveles de ensilaje de avena (*Avena sativa*, variedad *cayuse*) como alternativa para el uso en épocas de escases de forraje en el trópico alto de Nariño, Colombia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización y clima

El experimento se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación Obonuco en el área de ganadería propiedad de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Agrosavia), ubicado en el corregimiento de Obonuco, municipio de Pasto (Nariño – Colombia), con coordenadas: N 1°11'29,6" y W 77°18'47,9", esta zona se encuentra a una altura de 2.865 m.s.n.m, temperatura media de 10°C, precipitación anual de 841,57 milímetros (mm) y una humedad relativa del 83%, que corresponde a la zona de vida bosque seco montano bajo según Holdridge [39]. El experimento se realizó durante los meses de febrero y marzo 2.018 presentando precipitaciones promedio de 60 mm, atribuible en la zona como periodo de bajas precipitaciones.

### Animales

Se seleccionaron seis vacas F1 cruces entre kiwi cross x Holstein en buen estado de salud, homogéneas en peso: 4kg peso vivo (PV) al iniciar el experimento, condición corporal (CC) de 3,25 con una edad de 3 años (a), de primer parto, en primer tercio de lactancia y con una producción promedio diaria en leche de 9,4 litros (L) (sin suplementación alguna).

TABLA I  
CARACTERÍSTICAS DE LAS VACAS KIWI-CROSS X  
HOLSTEIN AL INICIAR EL EXPERIMENTO.

Parámetro	Media + DE
Peso vivo (kg)	412 ± 20,5
Condición corporal (CC)	3,25 ± 0,2
Días de lactancia (DEL)	70,9 ± 9,4
Producción leche (L/día)	9,4 ± 3,5
Contenido de grasa %	4 ± 1,6
Contenido de proteína %	3,4 ± 0,32
Sólidos totales %	13,5 ± 1,48

## Sistema de pastoreo

Durante esta investigación los animales pastorearon en praderas de pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*) se utilizó un pastoreo rotacional por franjas. La ocupación de cada franja fue de 1 día (d) y el periodo de descanso para el pasto kikuyo fue de 35 d. El área de las franjas de pastoreo se definió de acuerdo a la carga animal. El manejo de la rotación fue mediante cinta eléctrica (Cinta electroplástica de 13 mm, 5 conductores – LHAURA – Colombia). Durante la época de estudio, por ser un periodo de bajas precipitaciones, no se realizó fertilización en las praderas.

## Dietas experimentales

Los tratamientos consistieron en tres niveles de oferta en MS de ensilaje de avena (T1 = 0%, T2 = 0,8%, T3 = 1,4%), con base en el PV. Para estimar el CMS se usó el modelo de la National Research Council (NRC) [55],  $CMS (kg/d) = (0,372 * LCG4\% + 0,0968 * PV^{0,75}) * (1 - e^{-(SEL + 3,67)})$  dónde: LCG: Leche corregida por grasa.; peso metabólico del animal, SEL: Semanas en lactancia. La avena se cosechó a los 160 d de edad. El material fue ensilado en bolsas silopac, el cual a partir de los 70 d post elaboración se empezó a suministrar a los animales. La suplementación del ensilaje se realizó dos veces al d en el ordeño de la mañana (5:00 horas-h-) y de la tarde (15:00 h). Una vez cada animal terminaba el ordeño, se le llevaba a un corral de manejo y se le suministraba la cantidad de ensilaje correspondiente en cubículos individuales, se registró diariamente la cantidad de ensilaje fresco ofrecido y rechazado. Luego del consumo de ensilaje y de acuerdo al manejo del hato, los animales se llevaban de nuevo a pastorear en praderas donde predominaba el pasto Kikuyo.

## Diseño experimental

Se utilizó un diseño cuadrado latino con arreglo de sobrecambio. Cada periodo de evaluación correspondió a 12 d divididos en 5 d de acostumbamiento y 7 de evaluación. Se evaluaron 3 periodos, dentro de los cuales se aleatorizó cada uno de los tres tratamientos evaluados a 6 vacas de cruce Kiwi cross x Holstein. Durante los 7 d de evaluación se realizó ordeño a fondo en horario am-pm, en el cual se tomó una muestra de leche representativa que posteriormente fue homogeneizada para ser enviada al laboratorio para los respectivos análisis. De igual forma, durante los periodos de evaluación (d 12) se colectó sangre para medición de perfil metabólico. Dentro de los periodos de medición (7d) los d 1; 4 y 7 se recolectaron muestras de los alimentos para análisis bromatológico. El periodo de acostumbamiento fue para que las vacas se habituaran al ensilaje y al sistema de suministro de éste, en corral después del ordeño y el periodo de medición hace énfasis a los d en que se recolectaron las diferentes muestras

## Variables respuesta

## Consumo de materia seca (CMS)

Se estimó el consumo de materia seca total (CMST); mediante el método agronómico (entrada y salida) [38], se estimó la cantidad de pasto promedio consumido por cada animal, donde se asumió que, la diferencia entre el aforo de entrada y el de salida fue la cantidad de forraje consumido por los animales. Para la realización del aforo del kikuyo se utilizó la metodología del doble muestreo Haydock y Shaw [38]. Igualmente se midió la cantidad de ensilaje de avena/diario consumido por las vacas (ofertado-rechazado: consumo real), el CMST: es la suma de consumo de pasto y de avena, expresados en unidades de MS.

## Producción y calidad composicional de leche

Se registró la producción de leche (L/vaca/d durante los periodos de medición, en los ordeños am (05:00 h) y pm (15:00 h). El ordeño se realizó en sala de ordeño mecánico tipo espina de pescado (Read MILKING SYSTEMS -18 BAIL HERRINGBONE- Read Industrial LTDA- Nueva Zelanda) y durante los tres últimos d de cada periodo se tomó una muestra de leche por vaca en cada ordeño (am y pm). Las muestras individuales se recolectaron directamente de un medidor de leche en el ordeño mecánico (Tru test milk meters - Nueva Zelanda). Durante los d de muestreo se realizó un pool diario con las muestras correspondientes al ordeño de la mañana y de la tarde, para así tener una sola muestra total de leche por animal en el d. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al laboratorio de leche del Centro de Investigación (C.I) Tibaitata, perteneciente a Agrosavia (Bogotá – Colombia). A dichas muestras se les determinó el contenido de grasa, %; proteína, %; sólidos totales, % mediante el método de espectroscopia infrarroja [4], equipo: FOSS MilkoscanTM 7 RM - FOSS Analytical A/S – Dinamarca y el MUN (Nitrógeno Ureico Leche) o por sus siglas en inglés: Milk Urea Nitrogen (miligramos (mig) / decilitros (dL)) por método infrarrojo (espectrofotometría IR).

## Perfil metabólico en sangre

El d 12 de cada periodo de evaluación, los animales fueron llevados a una báscula (báscula MEDIGAN- S.A.S- Colombia) donde se registró individualmente el PV, además se tomó una muestra de sangre de la vena coccígea en tubos Vacutainer Improve ® (Clot activador). Después de dejar reposar por 10 minutos (min) cada muestra, se procedió a centrifugarlas a 2490 G durante 5 min en una centrifuga HERMLE z206a (Labortechnik GmbH – Alemania) donde se obtuvo suero sanguíneo. El suero se colocó en tubos ependorf de 15 mililitros (mL) y se congelaron a -20°C (Congelador: Biomedical Freezer MDF-U334 – Panasonic – Japón) para determinar las concentraciones de glucosa, colesterol y nitrógeno ureico en sangre (BUN), o por sus siglas en inglés (Nitrogen Ureic in Blood) como indicadores de niveles energéticos y proteicos del animal.

## Composición química de la dieta

Dentro de los periodos de medición (7d), los d 1; 4 y 7 se tomaron submuestras del ensilaje directamente de las bolsas, así como también muestras de la gramínea en la pradera, por el método del corte manual (Hand plucking) [17]. Las muestras se conservaron en refrigeración (Whirlpool-7WRS25FDBF-Whirlpool Internacional-México), al finalizar el periodo de medición se realizó un pool de las muestras. Dichas muestras se secaron en estufa de ventilación forzada marca Memmert (Memmert UF 260-Memmert GmbH + Co. KG – Alemania) a 65°C durante 72 h, posteriormente fueron molidas en un molino estacionario (Molino Retsch SM 100 - Retsch GmbH – Alemania) con una malla de 1,0 mm. Para la determinación de la composición química de los alimentos: proteína cruda (PC), Fibra detergente neutro (FDN), Fibra detergente acida (FDA), Hemicelulosa, Lignina, Extracto etéreo (EE), energía bruta (EB) energía neta de lactancia (ENL), cenizas y de la MS, se utilizó la técnica de Espectroscopia de reflectancia en infrarrojo cercano; NIRS DS 2500 - FOSS Analytical A/S – Dinamarca.

### Análisis estadístico

Los datos de consumo MS, producción y calidad composicional de leche y metabolitos sanguíneos, fueron sometidos a análisis de varianza, utilizando el software estadístico R Project for Statistical Computing, mediante el paquete lmer [11].

Para el análisis de los datos, se usó el modelo de efectos mixtos:  $Y_{ijkl} = U + T_i + P_j + C_k + E_{ijkl}$ . Donde:  $Y_{ijkl}$  : Variable

dependiente; U : Media;  $T_i$  : Efecto fijo del i-ésimo tratamiento ( $i = 1, 2, 3$ );  $P_j$  : Efecto aleatorio del j-ésimo periodo ( $j = 1, 2, 3$ );  $C_k$  : Efecto aleatorio de la k-ésima vaca ( $k = 1, 2, 3, 4..n$ );  $E_{ijkl}$  : Error residual.

Se consideró un nivel de significancia para efectos fijos de 0,05. En caso de rechazar la hipótesis de igualdad entre medias, se empleó el test de Tukey para identificar la diferencia entre tratamientos. En todos los análisis se evaluó la normalidad (Shapiro-Will) y homogeneidad de varianzas (test de Bartlett).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización química del ensilaje de Avena y la gramínea

La composición bromatológica del ensilaje de avena y del pasto Kikuyo utilizado en este trabajo se presenta en la TABLA II, los valores hallados en el ensilaje se encuentra dentro de los rangos reportados por la Federación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA) [32]. Las tablas de alimentos del FEDNA reportan para el ensilaje de avena, valores de MS entre 30 – 35%, los cuales también concuerdan con Calpa y Melo [19] para ensayos de valoración nutritiva en el altiplano de Nariño. Por su parte Bhandari y col. [14] también reportan valores de MS de 30% para ensilaje de avena, muy similares al encontrado en esta investigación (33,3%). De manera general, el contenido de MS para el pasto Kikuyo es bajo, comparado con otras gramíneas y forrajeras de trópico alto, lo que puede limitar su aporte de nutrientes al animal [25]. En el presente estudio, el contenido de MS fue de 20 %, mayor a lo reportado por Duque y col. [29] y Mejía y col. [50], quienes relacionan porcentajes (%) de MS de 10,9 y 14%, respectivamente, en muestras de Kikuyo con 35 d promedio de rebrote en el trópico alto del departamento de Antioquia (Colombia). El alto contenido de MS del Kikuyo en este ensayo, posiblemente se deba a que fue cosechado en época de bajas precipitaciones, donde aumenta la concentración de MS del forraje.

El valor de PC del ensilaje en el presente trabajo (9,03%) está por encima de lo reportado por León y col. [45], López y col. [46] y Bilal y col. [15], quienes reportan datos de 7,3; 7,2 y 7,08 %, respectivamente, de PC para ensilajes de avena (*sativa*). En cuanto al contenido de proteína en la gramínea (17,8%), ésta se encuentra dentro de los rangos normales para el pasto kikuyo en sistemas lecheros de trópico de altura en el país. Al respecto, Soto y col. [68]; Castro y col. [23]; Cardona y col. [21] y Duque y col. [29] reportan valores de 18,5; 16,1; 17,2 y 18,2% de PC, para muestras de pasto Kikuyo en varias regiones de trópico alto en Colombia. No obstante también se reportan valores de PC más altos para el pasto Kikuyo con edad de rebrote promedio de 35 d; al respecto Correa y col. [26] y Ramírez y col. [60] reportan porcentajes de PC de 21,5 y 25,4 para forraje cosechado en Colombia. Al respecto se debe tener en cuenta que, la calidad nutricional de los pastos depende además de la edad del corte, de otras prácticas como el manejo agronómico, época de cosecha,

**TABLA II**  
**COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ENSILAJE DE AVENA**  
**Y EL PASTO KIKUYO, SUMINISTRADO A LAS VACAS**  
**EXPERIMENTALES**

Fracción	Unidad	Ensilaje	Pradera
Materia seca (MS)	%Alimento	33,3	20
Proteína cruda (PC)	%MS	9,03	17,8
Fibra detergente neutro (FDN)	%MS	48	52
Fibra detergente ácido (FDA)	%MS	23	27
Hemicelulosa	%MS	24,7	24,6
Lignina	%MS	4,5	6,3
Extracto etéreo (EE)	%MS	8,00	2,00
Energía bruta (EB)	Mkal.kg <sup>-1</sup> MS	4,03	4,12
Energía neta de lactancia (ENL)	Mkal.kg <sup>-1</sup> MS	1,7	1,3
Cenizas	g/kg MS	7,03	9,1
Calcio (C)	g/kg MS	0,52	0,5
Fósforo (P)	g/kg MS	0,25	0,32

entre otras [22].

En cuanto al contenido de FDN y FDA del ensilaje se encontraron valores de 48 y 23,75%, respectivamente, valores menores para ensilajes de avena según lo reportado por Lopez y col. [46] (55% FDN y 31,4% FDA) y Mojica y col. [52] (67,2% FDN y 50,1% FDA), quienes establecieron el material y elaboraron ensilajes, en zonas de trópico alto de los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, Colombia, respectivamente, con condiciones agroclimáticas muy similares a las del presente experimento. En caso de que se fuera a utilizar este suplemento como único alimento en épocas críticas de escases de forrajes, los valores de FDN (48 %) están dentro de los rangos que sugiere la NRC [55], de una FDN mínimo de 25% en la dieta, apropiada para estimular rumia y mantener activas las funciones ruminales [8].

El contenido de FDN generalmente se asocia con un bajo contenido de MS de las gramíneas, esta fracción se relaciona con un mayor llenado del rumen en detrimento del consumo de CMS [6,53]. En este trabajo se hallaron valores de FDN: 52% y de FDA: 27%, valores dentro de los rangos recomendados por la NRC [55] para vacas lactantes. Los valores de FDN y FDA en esta investigación concuerdan dentro de los rangos reportados por Cardona y col. [21] y Duque y col. [29], para muestras de Kikuyo con edades de 35 d de rebrote promedio, las cuales fueron FDN: 55 y 56% y FDA: 24 y 31, %, respectivamente.

La energía neta de lactancia (ENL) contenida en los alimentos es muy importante para mantener la productividad láctea [55], en la presente investigación los valores de ENL para el ensilaje de avena y para el pasto Kikuyo fueron de 1,7 y 1,3 Mcal/kgMS, respectivamente. El valor encontrado de ENL en el ensilaje de este trabajo, fue superior a lo reportado por Mojica y col. [52], también para ensilaje de *Avena sativa* (1,33 Mcal/kgMS). Además estos, mismos autores encontraron valores de ENL para el pasto Kikuyo de 1,57 vs 1,3 Mcal/kgMS hallados en las praderas de *Cenchrus clandestinus* en este estudio. En general, los valores de contenido energético de gramíneas utilizadas en la alimentación de vacas lecheras en zonas templadas oscila entre 1,53 y 1,67 ENL Mcal/kg/MS, valores muy por encima de los reportados en el país para el pasto kikuyo, gramínea base en los sistemas productivos lecheros en Colombia [25,49]. El bajo

valor energético de gramíneas como el Kikuyo hace necesario que se suplemente a los animales con fuentes nutricionales más energéticas, como el ensilaje de avena en zonas lecheras del trópico de altura colombiano.

### Consumo de materia seca (CMS)

El CMS es una variable sumamente importante en nutrición de rumiantes, del CMS depende la disponibilidad de nutrientes totales, para mantener y mejorar el estatus nutricional y sanitario en el animal [55]. La estimación del CMS en bovinos en pastoreo sigue siendo una limitante técnica, debido a que son complejos los múltiples mecanismos que regulan el consumo y la selectividad del alimento [36]. El pasto Kikuyo es la gramínea predominante en los sistemas de lechería del departamento de Nariño, así como en la ganadería de trópico alto de Colombia. El kikuyo, pese a ser la base forrajera de bovinos tipo leche en el trópico alto andino de Colombia, tiene múltiples limitaciones; básicamente debido a su alto contenido de fibra detergente neutro (FDN), bajo contenido de carbohidratos no estructurales (CNE) lo que hace que disminuya la palatabilidad y altas cantidades de PC, originadas por el exceso de fertilización nitrogenada [35, 56].

Aunque la FDN es importante para mantener activos los mecanismos de rumia, salivación, pH adecuado, y concentración de grasa en leche, generalmente los excesos de esta fracción es lo que más limita el consumo en rumiantes. Alta ingestión de FDN disminuye la tasa de pasaje ruminal [8,44], además de la cantidad de FDN, otros factores como; el sistema de pastoreo y la edad de corte inciden directamente sobre la calidad nutricional de las pasturas y su palatabilidad. En esta investigación el consumo de kikuyo/animal/d en todos los tratamientos (TTOS) fue de 10,41 kg/MS, este valor se obtuvo con la metodología de aforos, por lo tanto el dato es un valor promedio, el único consumo que varió fue el de CMST debido a la inclusión del ensilaje.

Los datos de consumo de kikuyo (10,41 kg/MS/d), están dentro del rango para vacas lecheras en el trópico alto colombiano, al respecto Betancur y Trujillo [13] y Flores y Correa, [33] encontraron en el norte del departamento de Antioquia, consumos de pasto kikuyo de 10,9 y 11,1 kg/MS/d en vacas Holstein de primer tercio de lactancia. Mejía y col. [50], también en la misma zona reportan

**TABLA III**  
**EFFECTO DE LOS NIVELES DE INCLUSIÓN DE ENSILAJE (AVENA), SOBRE EL CONSUMO DE MATERIA SECA (KG/MS/DÍA) EN VACAS F1 KIWI CROSS X HOLSTEIN**

Componente	T1	EE±	T2	EE±	T3	EE±	P value
CMS ensilaje avena	-	-	3,0 <sup>b</sup>	0,1	4,72 <sup>a</sup>	0,15	<0,001
CMST	10,41	0,021	13,42 <sup>b</sup>	0,1	15,14 <sup>a</sup>	0,16	<0,001

CMS: consumo materia seca; CMST: consumo materia seca total; T1: 0% inclusión ensilaje de avena; T2: 0,8% inclusión ensilaje de avena; T3: 1,4% inclusión ensilaje de avena. EE: error estándar; a, b valores con superíndice no comunes en la horizontal difieren P<0,05 (Tukey).

consumos de 13,6 y 13,3 kg/MS/d en vacas Holstein pastoreando en un sistema silvopastoril y en un monocultivo de kikuyo, respectivamente, valores un poco mayores a lo encontrado en esta investigación. En cuanto al consumo de ensilaje de avena éste fue diferente ( $P < 0,05$ ) entre los TTOS; T2 y T3, los cuales incluyeron 0,8 y 1,4% de ensilaje, respectivamente (respecto al PV). Para T2 se encontraron valores de 3,0 y para T3 de 4,72 kg/MS/ensilaje/d, estos datos de consumo confirman que efectivamente las vacas consumieron más ensilaje a medida que aumento la oferta y que probablemente si la oferta hubiera sido mayor el consumo posiblemente también; no siempre a mayor oferta se encuentra mayor consumo, esto depende de la calidad composicional, palatabilidad y forma de suministro del ensilaje. Al respecto, León y col. [45] encontraron valores de 3 y 6,74 kg/MS/ensilaje de avena/d en vacas Holstein de la sabana de Bogotá, con inclusiones del 0,7 y 1,4% de ensilaje respecto al PV. Al igual que en el presente estudio, los datos reportados por los anteriores autores concuerdan cuando se ofreció un nivel de ensilaje de avena de 0,8 y 0,7 % respecto al PV, pero cuando se ofreció el 1,7% de ensilaje, el consumo de las vacas kiwi-cross x Holstein fue menor (2,02 kg MS), respecto a las Holstein, la diferencia en el consumo; probablemente se dio debido al mayor tamaño del rumen y mayores requerimientos nutricionales de las Holstein, lo que aumenta la ingestión de ensilaje.

El ensilaje de avena es un suplemento de la pastura, cuando la dieta es basada solo en forraje de avena, se han encontrado valores de consumo mucho más alto que solo para ensilaje, como el que reportan Salgado y col. [54], de hasta 18,9 kg/MS/forraje de avena/d en vacas Holstein. En la presente investigación, el consumo del ensilaje fue bueno, éste podría ser una opción de suplementación en épocas de escasas de pasturas en la zona alto andina de Nariño, no obstante se debe seguir estudiando y relacionando el consumo de ensilaje de avena con la productividad animal y la relación costo-beneficio

En la TABLA IV se presentan los resultados para las variables de producción y calidad composicional de leche. En la presente investigación, la variable producción de leche (L/d) presentó diferencia estadística significativa ( $P < 0,05$ ), no así para las

demás variables de calidad composicional (% grasa, % proteína, % sólidos totales, MUN (mg/dL)). Las vacas en los tratamientos (TTOS) T2 (0,8% inclusión ensilaje de avena) y T3 (1,4% de inclusión de ensilaje de avena) presentaron mayores niveles de producción de leche, respecto a T1 (0% inclusión ensilaje de avena). T2 produjo 0,65 Ly T3 1,14 L de leche más respecto a T1, la inclusión de los diferentes niveles de ensilaje de avena en la dieta aumentaron la producción de leche, aunque no hubo diferencia estadística entre los TTOS que incluyeron el ensilaje.

Para la variable producción de leche, la suplementación con ensilaje de avena presentó un efecto positivo, mejorando el rendimiento productivo de las vacas. Respecto a estos resultados, Bargo y col.[10] sostiene que, el objetivo de suplementar con ensilajes es tratar de aumentar el CMS y la ingestión de energía en los animales, respecto a aquellos valores que se pueden obtener solo con pastoreo. Holmes y col. [40] afirman que, la alimentación de las vacas lecheras debe estar basada en el consumo de forrajes, pero debido a que la cantidad y calidad de las pasturas no es constante a través del año, se hace primordial implementar estrategias de suplementación estratégica, para mantener y/o aumentar la producción de leche en los animales según su mérito genético.

Las vacas del experimento se encontraban en el primer tercio de lactancia, que es donde mayores requerimientos nutricionales tienen los bovinos, para sostener la alta producción láctea y garantizar un pronto retorno al celo [43]. En todos los TTOS se evidenció aumento de la producción de leche L/vaca/d, respecto a la producción inicial ( $9,4 \pm 3,5$  L/vaca/d) debido seguramente a que las vacas continuaron acercándose a su pico de producción, en las semanas siguientes al inicio del experimento. Los animales que recibieron suplementación con ensilaje de avena (0,8 y 1,4 % respecto al PV, tuvieron mayor rendimiento productivo, debido posiblemente a un mayor consumo de energía, proveniente de carbohidratos no estructurales (CNE) y de la fracción energía neta de lactancia (ENL) que provenían del ensilaje, el cual posiblemente cubrió en mayor medida la demanda de nutrientes, comparativamente con aquellos animales que solo consumieron pasto kikuyo. Al respecto Correa y col. [24] encontraron en vacas

TABLA IV  
**EFFECTO DE LOS NIVELES DE INCLUSIÓN DE ENSILAJE (AVENA), SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD COMPOSICIONAL DE LA LECHE EN VACAS F1 KIWI CROSS X HOLSTEIN**

Componente	T1	EE±	T2	EE±	T3	EE±	P value
PL, litros/vaca/día	9,36a	0,4	10,01b	0,4	10,5b	0,4	0,0004
Contenido de grasa, %	4,02	0,21	4,01	0,21	4,21	0,21	0,7327
Contenido de Proteína %	3,45	1,27	3,4	1,27	3,45	1,27	0,4776
Contenido de Sólidos Totales %	12,45	0,38	12,53	0,38	12,63	0,38	0,8804
MUN (mg/ dL)	10,91	0,53	10,01	0,53	9,2	0,53	0,1449

T1: 0% inclusión ensilaje de avena; T2: 0,8% inclusión ensilaje de avena; T3: 1,4% inclusión ensilaje de avena. EE: error estándar; a, b valores con superíndice no comunes en la horizontal difieren  $P < 0,05$  (Tukey).



Holstein de trópico alto colombiano, que existe correlación alta y positiva entre el consumo de ENL y la producción de leche. También añaden que es sistemas de pastoreo donde predomina el kikuyo, los valores de FDN y lignina son muy altos, lo que hace más crítico un buen aporte de energía para al animal, esto obliga a buscar fuentes de suplementación.

El efecto de la suplementación con ensilajes sobre la respuesta productiva (producción y calidad composicional) en vacas lecheras es variable. Se han reportado incrementos sobre la producción de leche y concentración de algunos nutrientes, al incluir ensilajes en la dieta, no obstante otros estudios no muestran cambios significativos para estas variables [58]. Según Mizubuti y col. [51], Mojica y col. [52] y Nkosi y col. [57], la respuesta animal a la suplementación con ensilajes está posiblemente relacionada con la calidad composicional del material ensilado, el nivel de oferta, la interacción ruminal de los nutrientes de la dieta y los requerimientos nutricionales del animal.

Para tratar de corroborar lo anterior, al realizar una búsqueda bibliográfica que comparara la utilización de ensilaje de avena en vacas lecheras, en trópico de altura y con condiciones similares a la de esta investigación, se encontró que el efecto del ensilaje sobre el rendimiento productivo de los animales es muy variable. Al respecto Lopez y col. [46] evaluaron tres TTOS (T1: pastoreo de kikuyo + ensilaje de avena; T2: pastoreo de kikuyo + ensilaje de avena + suplemento energético-proteico; T3: pastoreo de kikuyo + suplemento energético-proteico). La mejor respuesta en producción de leche la obtuvieron con el T2 (11,97 L), y para los TTOS T1 y T3 se encontraron valores de 9,3 y 10,3 L de leche, respectivamente. Los autores sostienen que, obtuvieron la mejor respuesta productiva al combinar dos fuentes energéticas (ensilaje + suplemento) con la pastura. Al respecto es bien sabido que, las pasturas utilizadas como base forrajera en los sistemas ganaderos de trópico alto del país, son deficientes en energía.

La deficiencia de carbohidratos solubles (CHOS), como fuente de energía en la dieta, es una de las principales limitantes para la producción de leche, así mismo esto se relaciona con bajos contenidos de proteína en la misma [25,68]. De ahí que los productores tengan que suplementar con fuentes energéticas como los alimentos concentrados, aumentando sus costos de producción, debido a que la mayoría de materias primas son importadas. O por el contrario, elaborar y utilizar ensilajes de cereales como la *Avena sativa*, las cual puede ser una fuente de alimentación mucho más barata que los concentrados [9].

Elizalde y col. [30] evaluaron el efecto de tres ensilajes de cereales (*Avena sativa*, *Triticum* spp y *Hordeum vulgare*) sobre la producción de leche en vacas de primer parto de la raza Overo colorado. Los resultados concluyeron que la mayor productividad ( $P < 0,05$ ) fue para las vacas que consumieron ensilaje de cebada (14,2 L/leche/d y consumo de ensilaje: 11,7 kg/MS/d), seguido de ensilaje de avena y de trigo (E avena: 13,2 L/leche/d y 10,2 kg/MS/d y E trigo: 13,3 L/leche/d y 12,3 kg/MS/d), a las vacas

en todos los TTOS se les ofreció 2,75 kg/MS de un suplemento energético-proteico. Los autores argumentan que la mayor productividad para los animales suplementados con ensilaje de *Hordeum vulgare* se debió posiblemente a un mayor consumo de éste, debido a su menor contenido de FDN y FDA y mayor % de carbohidratos solubles, respecto a los otros dos cereales. Lo que confirma la teoría de que el valor nutricional del ensilaje incide de manera directa sobre la productividad, independiente del mérito genético del animal para producir leche.

Guadarrama y col. [37] evaluaron durante 12 semanas (sem) (época seca) el efecto del ensilaje de avena y de maíz (*Zea maíz*), sobre la productividad de vacas Holstein, pastoreando praderas de *Lolium perenne* y *Trifolium repens* en pequeñas ganaderías en el trópico alto de México. Los resultados de la investigación no arrojaron diferencia estadística sobre la producción de leche entre los TTOS (16 L/vaca/d). Sin embargo, las vacas suplementadas con ensilaje de maíz, tuvieron una mejor condición corporal al finalizar la investigación.

También en zona de trópico alto en Costa Rica, Yuste y col. [69], utilizando vacas Jersey (peso promedio 350 kg), pastoreando praderas de *Cenchrus clandestinus* encontraron que, al suplementar los animales con 1,5 kg/MS/ensilaje de avena, hubo tendencia ( $P = 0,0925$ ) al incremento de la producción de leche. Las vacas suplementadas con el ensilaje de avena tuvieron una producción de 15,6 L/vaca/d vs 14,8 L/vaca/d de las vacas no suplementadas con el ensilaje. En dicho experimento no se presentó diferencia estadística para las variables porcentaje (%) proteína y (%) grasa, siendo los promedios de 3,55 y 4,51 para ambos tratamientos, respectivamente.

Investigando sobre cómo implementar suplementación estratégica y como mejorar la respuesta productiva de bovinos en zonas de trópico alto de Colombia, Mojica y col. [52], evaluaron el efecto de la inclusión de 0; 0,7 y 1,4% PV de ensilaje de *Avena sativa*, sobre variables productivas en vacas Holstein, pastoreando praderas de Kikuyo. Según los autores, la suplementación con ensilajes no afectó la producción diaria de leche/vaca ( $P > 0,05$ ), encontrándose valores de 22,2 L/vaca/d (0% inclusión de ensilaje), 20,1 L/vaca/d (0,7% inclusión) y de 20,1 L/vaca/d (1,4 % inclusión).

Así mismo, los autores reportan que los sólidos totales (ST) variaron ( $P < 0,01$ ) dependiendo el tercio de lactancia, disminuyendo su concentración en vacas de primer vs vacas de segundo tercio. Así mismo, la concentración de proteína se vio disminuida en vacas de segundo tercio respecto a vacas de primer tercio, a medida que se aumentó la oferta de ensilaje en la dieta, la grasa en leche también varió, ésta aumentó ( $P < 0,01$ ) a medida que la oferta de ensilaje fue mayor y fue más evidente este cambio en animales de segundo tercio de lactancia. Los autores concluyen que, la suplementación con ensilaje de avena sobre variables productivas en vacas lecheras tiene efectos variables según el nivel de inclusión y tercio de lactancia, para lo cual aconsejan seguir realizando evaluaciones al respecto.

El efecto menos significativo en la suplementación nutricional de vacas lecheras, es la fracción proteínica de la leche, este componente depende mucho de la genética del animal y en menor medida de aspectos nutricionales o ambientales [10]. Al respecto, en la presente investigación los valores de proteína no presentaron diferencia estadística, el promedio general para todos los TTOS fue de 3,43%, valor dentro de los rangos normales para este tipo de cruce y sin alteraciones respecto a los datos de proteína en leche al iniciar el experimento, los cuales fueron de  $3,4 \pm 0,32$  %. Se debe recordar que las vacas del presente ensayo fueron de primer parto, por lo tanto se espera que sigan aumentando paulatinamente la concentración de proteína entre el 0,02 y 0,05 %, a medida que aumenten las lactancias [7]. En cuanto al promedio de proteína de la raza Holstein en vacas adultas multíparas, el cual según Hwang y col. [41], oscila entre 3,15 a 3,25% y cuya raza predomina en la zona alto andina de Colombia, los valores de proteína en esta investigación (donde se encuentra incluido la genética Holstein) fueron mayores. Pese a que las vacas aún les falta madurez fisiológica, esto podría dar un indicio del mérito genético del cruce Kiwi cross x Holstein en sintetizar sólidos en leche.

Al contrario de la proteína, la concentración de grasa en leche si está altamente influenciada por la calidad nutricional de la dieta, en gran parte por el nivel y la calidad de la fibra ingerida por el animal. Al respecto se considera que hay relación entre el contenido graso y los valores de FDN y FDA de la ración [3]. El contenido de grasa en leche en este trabajo fue en promedio de 4,08%, sin embargo hubo un leve incremento numérico para la grasa en leche de las vacas en el T3 (1,4% de inclusión de ensilaje de avena). En T3 se encontraron valores de grasa de 4,21%, mayor que los valores hallados en T1 (4,02%) y T2 (4,01%), en teoría la concentración total de FDN en las dietas (forraje + ensilaje) para los diferentes TTOS fue: T1: 52%, T2: 51% y T3: 51% de FDN.

Los valores de grasa están dentro de los rangos normales para la raza y tipo de manejo. Los datos hallados de FDN en todos los TTOS, se ajustan a lo sugerido por la NRC y proviene en su mayoría del forraje (>75%). Según lo reportado por Banakar y col. [8], cuando hay un adecuado consumo de fibra efectiva se mejora la rumia, salivación y se obtiene un pH adecuado a nivel ruminal, lo que favorece la síntesis de grasa láctea. En esta investigación

los datos de consumo de FDN son similares, pese a que la oferta de ensilaje vario según el TTO; no obstante la concentración de grasa se mantuvo estable, posiblemente debido a una adecuada ingestión de FDN efectiva.

La urea es el producto final del metabolismo de las proteínas. Algunas proteínas que la vaca no utiliza en su metabolismo y producción, se descomponen en amoníaco (NH<sub>3</sub>), el cual es tóxico para los tejidos y se convierte en urea en el hígado [16]. Para la variable MUN (miligramos (mg)/decilitros (dL)) no se presentó diferencia estadística entre los TTOS. Los valores de MUN fueron respectivamente T1: 10,91; T2: 10,01 y T3: 9,2 (mg/dL), valores que están considerados dentro del rango normal según Doo Hong, [28], el cual sostiene que valores de MUN entre 9 y 12 (mg/dL), se consideran como buenos y donde hay buen uso del nitrógeno. El MUN es una herramienta muy importante para tratar de evaluar el balance y uso de proteína y energía a nivel ruminal.

El MUN indica la concentración de urea que se encuentra en la leche y está altamente correlacionada con la concentración de urea en sangre [28]. En vacas lecheras de trópico alto, debido al manejo nutricional, casi siempre un contenido total de proteínas alto, combinado con bajas concentraciones de energía en la dieta, son los responsables del contenido de urea en la leche [27]. La determinación del MUN en leche, es una herramienta práctica en la que el productor puede tomar decisiones, evitando excesos o deficiencias nutricionales.

En la TABLA V, se muestran los resultados de las variables de perfil metabólico (BUN, Colesterol y Glucosa (mmol/L), para las cuales no se encontró diferencia estadística (P>0,05). Las concentraciones de metabolitos sanguíneos representan la guía de un adecuado estatus de nutrientes, con relación a la utilización de los mismos. Los valores de estos metabolitos generalmente son independientes del estado fisiológico del animal y permiten una indicación inmediata del estado nutricional en un momento determinado [59, 62].

Al respecto Campos y col. [20] evaluaron variables de perfil metabólico en siete grupos raciales lecheros, en el sur occidente de Colombia y cuyo manejo era basado en pastoreo. Para el caso de los animales Holstein y Jersey, las cuales son el tipo racial con más parentesco a la Kiwi cross x Holstein estudiada

**TABLA V**  
**EFFECTO DE LOS NIVELES DE INCLUSIÓN DE ENSILAJE (AVENA), SOBRE VARIABLES DE PERFIL METABÓLICO EN VACAS F1 KIWICROSS X HOLSTEIN**

Componente	T1	EE±	T2	EE±	T3	P-value
BUN (mmol/L)	4,85	0,38	4,51	0,38	4,44	0,9753
Colesterol (mmol/L)	2,6	0,34	2,8	0,33	3,5	0,2445
Glucosa (mmol/L)	5,21	0,44	5,01	0,45	5,1	0,2642

T1: 0% inclusión ensilaje de avena; T2: 0,8% inclusión ensilaje de avena; T3: 1,4% inclusión ensilaje de avena BUN: nitrógeno ureico en sangre; EE: error estándar; a, b valores con superíndice no comunes en la horizontal difieren P<0,05 (Tukey).

en este experimento, encontraron valores de BUN de 3,7 y 3,3 mmol/L para Holstein y Jersey respectivamente, menores a las encontradas en este trabajo. El valor de BUN en esta investigación, está dentro del normal para vacas lactantes que debe ser máximo 6,94 mmol/L, valores por encima de este, se asocian con índices de baja fertilidad hasta de un 20% en vacas lecheras [63].

Los valores de colesterol no mostraron diferencia estadística ( $P>0,05$ ), siendo el promedio de 2,96 mmol/L para todos los TTOS. Los valores de referencia para colesterol están un poco mayores respecto al rango normal que se sugiere en vacas lecheras, se indica que un rango adecuado debe oscilar entre 1,5 y 2,28 mmol/L [43]. Así mismo en esta investigación, los valores de colesterol son mayores que lo reportado por Campos y col. [20] para vacas Holstein (2,1 mmol/L) y para vacas de la raza Jersey (2,3 mmol/L), tipos raciales afines con los evaluados en esta investigación. Generalmente los bajos niveles de colesterol en sangre se relacionan con menor síntesis de hormonas tiroideas, entre ellas los estrógenos y la progesterona. Normalmente los valores de colesterol en vacas lecheras no son altos, por lo tanto se les asocia con bajos índices a nivel reproductivo, de ahí la importancia de medir este parámetro en el hato.

Los valores medios para colesterol (mmol/L) en este ensayo concuerdan con los reportados por Gómez [34], en vacas lecheras *Bos taurus x Bos indicus*, (en fincas ganaderas del departamento del Valle del Cauca-Colombia) al ser suplementadas con una fuente energética (propilenglicol), encontró medias de colesterol de 2,9 mmol/L. en la misma investigación se reporta que la concentración sérica de colesterol fue disminuyendo a medida que avanzó la lactancia, lo cual concuerda con autores como Seifi y col. [66]. Lo anterior se puede explicar debido a la tendencia que tiene el animal a mantener síntesis de lípidos como tejidos de reserva, disminuyendo así la síntesis de colesterol, cuya demanda no es tan alta en el parto y a medida que avanza la lactancia [2].

Según Kaneko y col. [42], las concentraciones séricas normales de glucosa deben estar entre 2,5 y 4,16 mmol/L, en este ensayo las vacas en todos los tratamientos estuvieron por encima de este rango, siendo el promedio de 5,1 mmol/L. Al respecto Macrae y col.[47] consideran que, los valores óptimos de glucosa en vacas lactantes deben estar por encima de 3 mmol/L. Valores de MUN altos y bajos niveles de glucosa en sangre, se asocian con un balance energético negativo (BEN) en las vacas. Cuando los niveles de glucosa se encuentran por debajo de 3mmol/L, los rumiantes acuden a la gluconeogénesis para completar los requerimientos de glucosa, utilizando como precursor propionato en el hígado [62]. Al parecer el nivel de nutrientes (energía-proteína) suministrados en las diferentes dietas (TTOS) fue adecuado, ya que los animales no presentaron síntomas de BEN, ratificado por los valores de MUN-BUN moderados y los

valores de glucosa en sangre (mmol/L) apropiados, los cuales no indicaron deficiencia de glucosa.

## CONCLUSIONES

En la presente investigación, el suministro de ensilaje de avena mejoró la producción de leche en las vacas, respecto al tratamiento control. La composición de la leche (proteína, grasa, sólidos totales y nitrógeno ureico en leche) no fue afectada por los tratamientos experimentales y se mantuvo dentro de los rangos normales para el tipo racial empleado. Además, los valores de perfil metabólico (Glucosa, Colesterol y BUM) fueron similares entre tratamientos y estuvieron dentro del rango considerado normal. Para la zona alto-andina del departamento de Nariño, la utilización de ensilajes de cereales se constituye en una alternativa viable para aumentar la producción de leche y, de igual manera, podría evitar la marcada disminución de la producción láctea asociada a la estacionalidad de la producción forrajera. Se hace conveniente seguir evaluando este cereal forrajero (*Avena sativa L-Cayuse*) u otras variedades de avena, como posibles alternativas para suplir el déficit de materia seca y de energía, los cuales aumentan en las épocas de sequía en la zona.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Convenio Especial de Cooperación de Ciencia Tecnología e Innovación No. 882 – 2015 entre el Departamento de Nariño, y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Agrosavia. Financiado con recursos del Sistema General de Regalías SGR Asignados al Departamento de Nariño y recursos propios de AGROSAVIA. Gracias a este convenio se pudo desarrollar el Macroproyecto “Mejoramiento de la oferta forrajera, optimización de sistemas de alimentación y aseguramiento de la calidad e inocuidad de la leche en el trópico alto del departamento de Nariño”, que es de donde proviene este artículo científico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABEYSEKARA, S. The Nutritional Value of Oat Forages for Dairy Cows. 2004. Department of Animal and Poultry Science. University of Saskatchewan. Canadá. On line: <https://www.researchgate.net/publication/33675813>. 8.11.2018.
- [2] AEBERHARDK, B. Metabolic, Enzymatic and Endocrine Status in High-Yielding Dairy Cows - Part 2. **J.Vet.Med.** 48(2): 111-127. 2001.
- [3] ANDRADE, L.; BRAGA, R.; GUIMARÃES, P.; MATTANA, H.; GESTEIRA, S.; ROCHA, G. Performance of lactating dairy cows fed sunflower or corn silages and concentrate based on citrus pulp or ground. **Rev. Bras. Zoot.** 46(1):56-64. 2017.

- [4] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). AOAC Official method 972.16 Milk. Mid-infrared spectroscopic method. In: Official Methods of Analysis of AOAC International, AOAC. 105 pp. 2005.
- [5] APRÁEZ, J. E.; INSUASTY, E. G.; PORTILLA, J. E.; HERNÁNDEZ, W. A. Composición nutritiva y aceptabilidad del ensilaje de avena forrajera (*Avena sativa*), enriquecido con arbustivas: acacia (*Acacia decurrens*), chilca (*Braccharis latifolia*) y sauco (*Sambucus nigra*) en ovinos. **Vet. Zoot.** 6(1): 25-35. 2012.
- [6] ARELOVICH, H.M.; ABNEY, C.S.; VIZCARRA, J.A.; GALYEAN, M.L. Effects of Dietary Neutral Detergent Fiber on Intakes of Dry Matter and Net Energy by Dairy and Beef Cattle: Analysis of Published Data. **The Professional Anim. Sci.** 24(5):375–383. 2008.
- [7] BAILEY, K.; JONES, C.; HEINRICH, J. Economic returns to Holstein and Jersey herds under multiple component pricing. **J. Dairy Sci.** 88: 2269-2280. 2005.
- [8] BANAKAR, P.S.; ANAND - KUMAR, N.; SHASHANK, C.G.; NEETI, L. Physically effective fibre in ruminant nutrition: A review. **J. Pharmacog. Phytochem.** 7(4): 303-308. 2018.
- [9] BARAHONA, R.; CUESTA, P.; BÁEZ, F. Producción y evaluación del uso de ensilajes en sistemas de producción de lechería especializada de Nariño. 2003. Agrosavia-Fedegan. Colombia. En Línea: [https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/16535/40656\\_26057.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/16535/40656_26057.pdf?sequence=1&isAllowed=y). 8.11.18.
- [10] BARGO, F.; MULLER, L.D.; KOLVER, E.S.; DELAHOY, J.E. Invited Review: production and digestión of supplemented dairy cowa on pasture. **J. Dairy Sci.** 86(1): 1 - 42. 2003.
- [11] BATES, D.; MÄCHLER, M.; BOLKER, B.M.; WALKER, S.C. Package lme4: linear mixed-effects models using Eigen and S4. **R package.** 1: 1-9. 2014.
- [12] BENAVIDEZ, C.C.; MATTA, S.L. Ensilaje de afrecho de cervecería en sistemas de producción lechera de la Sabana de Bogotá. **Corpoica. Cien.Tecnol.Agro.** 11(2): 165-172. 2010.
- [13] BETANCUR, J. F.; TRUJILLO, L. G. Balance de nitrógeno en vacas lecheras de alta producción alimentadas con pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y dos niveles de suplementación de proteína no degradable en el rumen. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Trabajo de Grado. 30 pp. 2004.
- [14] BHANDARI, S. K.; NYACHOTI, C. M.; KRAUSE, D. O. Raw potato starch in weaned pig diets and its influence on postweaning scours and the molecular microbial ecology of the digestive tract. **J. Anim. Sci.** 87: 884-893. 2008.
- [15] BILAL, M.; AYUB, M.; TARIQ, M.; TAHIR, M.; NADEER, M.A. Dry matter yield and forage quality traits of oat (*Avena sativa* L.) under integrative use of microbial and synthetic source of nitrogen. **J. Soc.Agricult.Sci.** 16: 236-241. 2017.
- [16] BONIFAZ, N.; GUTIÉRREZ, F. Correlación de niveles de urea en leche con características físico-químicas y composición nutricional de dietas bovinas en ganaderías de la provincia de pichincha. **LA GRANJA. Rev.Cien.la Vida.** 18(2): 33-42. 2013.
- [17] BONNET, O.; HAGENAH, N.; HEBBELMANN, L.; MEURET, M.; SHRADER, A.M. Is Hand Plucking an Accurate Method of Estimating Bite Mass and Instantaneous Intake of Grazing Herbivores?. **Rangeland Ecol. Manage.** 64:366–374. 2011.
- [18] BOSCHINI, C.; PINEDA, L. Ensilaje de kikuyo (*Pennisetum clandestinum* o *Kikuyuocloa clandestina*) fermentado con tres aditivos. **Agron. Mesoam.** 27(1): 49-60. 2016.
- [19] CALPA, A.S.; MELO, S.L. Valoración nutritiva del ensilaje Obonuco Triticale 98 (*Triticum* spp.) y avena (*Avena sativa*) línea 15/85 y cayuse en la alimentación de vacas holstein mestizo en producción en el altiplano de Pasto-Colombia. 2003. En Línea: <http://biblioteca.udenar.edu.co:8085/bibliotecavirtual/viewer.aspx?&var=62522>. 15.11.2018.
- [20] CAMPOS, R. C. Indicadores metabólicos en razas especializadas en condiciones Tropicales en Colombia. **Acta Agron.** 56(2): 85-92. 2007.
- [21] CARDONA, J.L.; MAHECHA, L.; ANGULO, J. Efecto sobre la fermentación in vitro de mezclas de *Tithonia diversifolia*, *Cenchrus clandestinum* y grasas poliinsaturadas. **Agron. Mesoam.** 28(2): 405-426. 2017.
- [22] CARO, F.; CORREA, H.J. Digestibilidad posruminal aparente de la materia seca, la proteína cruda y cuatro macrominerales en el pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. **Livest. Res.Rural Develop.** 18(10): 143. 2006.
- [23] CASTRO, E.; CARULLA, J.; CÁRDENAS, E. Productive potential of *Lotus uliginosus* in specialized dairy systems at the high altitudes of Colombian Andes. **Irish J. Agr. Food Res.** 48: 277. 2009.
- [24] CORREA, H. J.; PABÓN, M. L.; SANCHÉZ, M.; CARULLA, J. E. Efecto del nivel de suplementación sobre el uso del nitrógeno, el volumen y la calidad de la leche en vacas Holstein de primero y segundo tercio de lactancia en el tró-

pico alto de Antioquia. **Livest. Res.Rural Develop.** 23(4): 77. 2011.

- [25] CORREA, C.H. J.; PABÓN, R.M.L.; CARULLA, F.J.E. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. **Livest. Res.Rural Develop.** 20(4): 59. 2008.
- [26] CORREA, H. J. Kinetics of macro-mineral release in the rumen from Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) harvested at two cutting intervals. **Livest. Res.Rural Develop.** 18 (2): 31. 2006.
- [27] CORTES, G.L.; MARROQUÍN, C.A.; ORTIZ, K.B. Evaluation of the ureic nitrogen parameter in milk obtained in a period of seven months in Hacienda la Montaña, Antioquia, Colombia. **REDVET** 19(3): 1-10. 2018.
- [28] DOO-HONG, M. What is Milk Urea Nitrogen and How is It Interpreted? 2013. Food Mr C Biology - Extension Forage Specialist, MSU UPES. En Línea: [https://www.canr.msu.edu/uploads/files/Research\\_Center/UPREC/Animal\\_Nutrition/milk\\_urea\\_nitrogen.pdf](https://www.canr.msu.edu/uploads/files/Research_Center/UPREC/Animal_Nutrition/milk_urea_nitrogen.pdf). 15.11.2018.
- [29] DUQUE, M.; ROSERO, R.; OLIVERA, M. Digestión de materia seca, proteína cruda y aminoácidos de la dieta de vacas lecheras. **Agron. Mesoam.** 28(2): 341-356. 2017.
- [30] ELIZALDE, H. F.; MENÉNDEZ, A. M. Evaluación de ensilajes de cereales de grano pequeño, sobre la producción de leche de vacas overo colorado. **Agro. Sur.** 32(2): 54-59. 2004.
- [31] ESPITIA, R.E.; VILLASEÑOR, M.H.; TOVAR - GÓMEZ, R.; LIMÓN, O.A. Momento óptimo de corte para rendimiento y calidad de variedades de avena forrajera. **Rev. Mex.Cien. Agr.** 3(4): 771-783. 2012.
- [32] FEDNA, C.S.; FERRET, A.; BATH, A. Tablas nutritivas de forrajes y subproductos fibrosos húmedos 2nd.Ed. 2016, Fundación española para el desarrollo de na nutrición animal. En Línea: <http://www.fundacionfedna.org/tablas-fedna-composicion-alimentos-valor-nutritivo>. 5.11.18.
- [33] FLÓREZ, L. A.; CORREA, H. J.; Efecto del tercio de lactancia y la época del año sobre el consumo de materia seca en vacas Holstein pastoreando kikuyo. **Rev CES Med. Vet. Zoot.** 12 (3): 181-194.2017.
- [34] GÓMEZ, L.L. Efecto de dos suplementos energéticos sobre el control del balance energético negativo en vacas de producción de leche. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ciencia Animal Palmira, Colombia. Trabajo de Grado. 69 pp. 2015.
- [35] GÓMEZ, L.M.; POSADA, S.L.; OLIVERA, M.; ROSERO, R.; AGUIRRE, P. Análisis de rentabilidad de la producción de leche de acuerdo con la variación de la fuente de carbohidrato utilizada en el suplemento de vacas Holstein. **Rev. Vet. Med.** 34:9-22. 2017.
- [36] GORDON, I.J.; PRINS, H.H. Introduction: Grazers and Browsers in a Changing World. In: **The Ecology of Browsing and Grazing.** Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Pp 309-319. 2008.
- [37] GUADARRAMA, J.; ESPINOZA, A.; GONZÁLEZ, C. E.; ARRIAGA, C.M. Inclusion of Maize or Oats-vetch Silage for Grazing Dairy Cows in Small-scale Campesino Systems in the Highlands of Central Mexico. **J. Appl.Anim. Res.** 32:19-23. 2007.
- [38] HAYDOCK, K.P.; SHAW, N.H. The comparative yield method for estimating dry matter yield of pasture. **Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.** 15: 663-670. 1975.
- [39] HOLDRIDGE, L.E. La clasificación de las zonas de vida de Holdridge. **Ecología basada en zonas de vida.** Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José, Costa Rica. 215 pp. 1978
- [40] HOLMES, C.W.; BROOKES, I.M.; GARRICK, D.J.; MACKENZIE, D.D.S.; PARKINSON,T.J.; WILSON, G.F. Grassland management. In: **Milk production from pasture. Principles and practices.** Massey University. New Zealand. 601 pp 2002.
- [41] HWANG, S.Y.; LEE, M.; CHIOU, P.W. Monitoring nutritional status of dairy cows in Taiwan using milk protein and milk urea nitrogen. **Asian-Aus. J. Anim. Sci.** 13(12): 1667-1673. 2000.
- [42] KANEKO, J.; HARVEY, J.; BRUSS, M. Carbohydrate metabolisms and its diseases. **Clinical Biochemistry of Domestic Animal.** Pp 46-80. 2008.
- [43] KOLVER, E. Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. **Proceedings of the Nutrition Society.** Dexcel (Formerly Dairyng Research Corporation) New Zealand. 62: 91-300. 2003.
- [44] KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A.J.; LEHMAN, H. A.; The effect of corn silage particle size on eating behaviour, chewing activities, and rumen fermentation in lactating dairy cows. **J Dairy. Sci.** 86:3343-3353. 2003.
- [45] LEÓN, J.M.; MOJICA, J.E.; CASTRO, E.; CARDENAS, E.A.; PABON, M.L.; CARULLA, J.E. Balance de nitróge-

- no y fósforo de vacas lecheras en pastoreo con diferentes ofertas de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) suplementadas con ensilaje de avena (*Avena sativa*). **Rev. Col. Cien. Pec.** 21: 559-570. 2008.
- [46] LÓPEZ, A.D.; SAAVEDRA, M.G.F.; ARREAZA, L.C.; MUÑOZ, M.J.G.; RODRÍGUEZ, M.C.E. Systems of feeding evaluation, like strategy to confront the seasonality in dairy cattle. **Cien. Agricult.** 9(2): 39-46. 2012.
- [47] MACRAE, A.; WHITAKER, D. A.; BURROUGH, E.; DOWELL, A.; KELLY, J. M. Use of metabolic profiles for the assessment of dietary adequacy in UK dairy herds. **Vet. Rec.** 159(20):655-61. 2006.
- [48] MATTA, S.L.; Estrategias modernas para la conservación de forrajes en sistemas de producción bovina tropical. **Corpoica. Cien. Tecnol.Agrop.** 6(2): 69-80. 2005.
- [49] MEESKE, R.; ROTHAU, A.; MERWE, G. D.; GREYLING, J.F. The effect of concentrate supplementation on the productivity of grazing Jersey cows on a pasture based system. **South African J. Anim.Sci.** 36 (2): 105–110. 2006.
- [50] MEJÍA, E.; MAHECHA, L.; ANGULO, A. Consumo de materia seca en un sistema silvopastoril de *Tithonia diversifolia* en trópico alto. **Agronom. Mesoamer.** 28 (2): 389-403. 2017.
- [51] MIZUBUTI, I.Y.; RIBEIRO, E.L.A.; ROCHA, M.A.; SILVA, L.D.F.; PINTO, A.P.; FERNANDES, W.C.; ROLIM, M.A. Consumo e digestibilidade aparente das silagens de milho (*Zea Mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e girassol (*Helianthus annuus* L.). **Rev. Brasil.Zoot.** 31(1): 267-272. 2002.
- [52] MOJICA, J.E.; CASTRO, E.; LEÓN, J.M.; CÁRDENAS, E.A.; PABÓN, M.L.; CARULLA, J.E. Efecto de la oferta de pasto kikuyo y ensilaje de avena sobre la producción y calidad composicional de la leche bovina. **Corpoica. Cien. Tecnol.Agrop.** 10(1): 81-90. 2009.
- [53] MORALES, A.; LEÓN, J.; CÁRDENAS, E.; AFANADOR, G.; CARULLA, J. Calidad de la leche, digestibilidad *in vitro* de la materia seca y producción de vacas alimentadas con gramíneas solas o asociadas con *Lotus uliginosus*. **Rev. Med. Vet. Zoot.** 60:32-48. 2013.
- [54] MUTAVHATSINDI, T.F.; NKOSI, B.D.; BALOYI, J.J.; LANGA, T. Effects of a fibrolytic enzyme and bacterial inoculants on the fermentation, chemical composition and aerobic stability of ensiled potato hash. **South African J. Anim. Sci.** 48(2): 244-252. 2018.
- [55] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC) .The nutrient requirement of dairy cattle. 7th.Ed. National Academy Press, Washington, D. C. Pp 381. 2001.
- [56] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC). Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th.Ed. Natl. Acad. Press. Washington, DC. Pp 248. 2000.
- [57] NKOSI, B.D.; MEESKE, R.; LANGA, T.; THOMAS, R. Effects of bacterial silage inoculants of whole-crop silage fermentation and silage digestibility in rams; **South Africa J. Anim. Sci.** 41(4): 350-359. 2011.
- [58] OZDUVEN, M. L.; KURSUN, Z.; KOC, F.; The Effects of Bacterial Inoculants and/or Enzymes on the Fermentation, Aerobic Stability and *in vitro* Dry an Organic Matter Digestibility Characteristics of Triticale Silages. **Kafkas Univ. Vet. Fak Derg.** 16 (5): 751-756. 2010.
- [59] PAMBU, R.; CRONJE, P.B.; CASEY, N.H. An evolution for the use of blood metabolite concentrations as indicator of nutritional status in free-ranging indigenous, goats. **South African J. Anim. Sci.** 30(2): 115-120. 2000.
- [60] RAMÍREZ, J.; SANDRA - POSADA, S.O.; NOGUERA, R. Effects of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) age and different forage: concentrate ratios on methanogenesis Efecto de la edad del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y la relación forraje: concentrado sobre la metanogénesis. **Rev.MVZ Córdoba.** 20(3):4726-4738. 2015.
- [61] RANGEL, E.; VILLASEÑOR, H.E.; TOVAR, R.; OLÁN, M.; LIMÓN, A. Momento óptimo de corte para rendimiento y calidad de variedades de avena forrajera. **Rev. Mex.Cien. Agríc.** 3(4): 771-783. 2012.
- [62] RAZZ, R. Y.; TYRONE, C. Urea, Phosphorus, Glucose and Insulin Contents of Lactating Cows Supplemented with Concentrate in a *Panicum maximum* and *Leucaena leucocephala* System. **Rev.Cientif.FCV-LUZ.** XIV (4): 365-369. 2004.
- [63] RHOADS, M. L.; GILBERT, R. O.; LUCY, M. C.; BUTLER, W. R. Effects of Urea Infusion on the Uterine Luminal Environment of Dairy Cows. **J. Dairy Sci.** 87 (9): 2896–2901. 2004.
- [64] RONCALLO, F.B.; SIERRA, M. A.; CASTRO, R.E. Rendimiento de forraje de gramíneas de corte y efecto sobre calidad composicional y producción de leche en el Caribe

- seco. **Corpoica. Cien.Tecnol.Agrop.** 13 (1): 71-78. 2012.
- [65] SALGADO, P.; THANG, V. Q.; THU, T. V.; TRACH, N. X.; LECOMNTE, P.; CUONG, V. C.; RICHARD, D.; Oats (*Avena strigosa*) as winter forage for dairy cows. **Trop. Anim. Health Prod.** 45(2):561-8. 2013.
- [66] SEIFI, H. A.; GORJI, M.; MOHRI, M.; DALIR, B.; FARZANEH, N. Variations of energy-related biochemical metabolites during transition period in dairy cows. **Compend. Clin.Pathol.** 16(2): 253–258. 2007.
- [67] SILVA, B.O.; LEITE, L.A.; FERREIRA, M.I.C.; FONSECA, L.M.; REIS, R.B. Silagens de girasol e de milho em dietas de vacas leiteiras: produção e composição do leite. **Arquiv.Brasil.Med.Vet.Zoot.** 56(6): 750-756. 2004.
- [68] SOTO, C.; VALENCIA, A.; GALVIS, R. D.; CORRERA, H. J. Efecto de la edad de corte y del nivel de fertilización nitrogenada sobre el valor energético y proteico del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). **Rev. Col. Cien. Pec.** 18(1): 17-26. 2005.
- [69] YUSTE, S.; SÁNCHEZ, W.; VEGA, A.; GUADA, J. A. Effects of substitution of kikuyu forage by oat silage on milk production and quality in dairy cows. 2016. Unión de entidades Españolas de Ciencia Animal (UEECA). España. En Línea. <http://ueeca.agripa.org/attachment/55c0b531-ff80-4c83-89e6-793001e264af> 15.11.2018.

# Genetic Diversity among Local Quail Using RAPD-DNA Marker

## Diversidad Genética Entre Codornices Locales Usando Marcadores Dna-Rapd

*Lajan Salahaldin Ahmed\* and Yousif Mohamed Salih AL-Barzinji*

*Animal Resources Department, College of Agriculture, Salahaddin University-Erbil*

*\* Email: Lajan.ahmed@su.edu.krd Email: Yousif.noori@su.edu.krd*

### ABSTRACT

The randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to detect the genetic variations and polymorphism among three different colors of local quail (desert, brown and white). Out of twenty random primers used, thirteen were able to amplify and showed bands. The total fragment number arrived 310 with size range from 250 to 2800 bp. Polymorphic fragments and unique bands in all samples were (34.36 and 2), respectively. However, OPA-04, OPS-01, OPB-01 and 10-MER loci have generated high polymorphic bands. The Nei's gene diversity for overall lines averaged 0.1026. The higher distance found among brown female with both white and desert female (27.614), while the lowest distance (4.002) recorded between white and desert (male and female) quails. The overall dendrograms clustered the quail lines into two clusters. The 1st one consisted of white and desert, and the 2nd one included only brown. It was concluded that the white was closer to desert quail than to the brown quail.

**Key words:** RAPD; polymorphism; genetic diversity; local quail

### RESUMEN

Los marcadores de ADN polimórfico amplificados al azar (RAPD) se utilizaron para detectar las variaciones genéticas y el polimorfismo entre tres colores diferentes de codornices locales (desierto, marrón y blanco). De los veinte cebadores aleatorios utilizados, trece pudieron amplificar y mostraron bandas. El número total de fragmentos llegó a 310 con un rango de tamaño de 250 a 2800 pb. Los fragmentos polimórficos y las bandas únicas en todas las muestras fueron (34,36 y 2), respectivamente. Sin embargo, los loci OPA-04, OPS-01, OPB-01 y 10-MER han generado altas bandas polimórficas. La distancia más alta se encontró entre las hembras marrones con hembras tanto, blancas como desérticas (27,614), mientras que la distancia más baja (4,002) se registró entre las codornices blancas y desérticas (machos y hembras). Los dendrogramas globales agruparon las líneas de codorniz en dos grupos. El primero consistía en blanco y desierto, y el segundo solo incluía marrón. Se concluyó que el blanco estaba más cerca de las codornices del desierto, que de las codornices marrones.

**Palabras clave:** RAPD; polimorfismo; diversidad genética; codornices locales



## INTRODUCTION

The Japanese quail (JQ) *Coturnix coturnix japonica*, at the start domesticated around the 11th century as a pet song fowl [5,11] is valued for its uniquely flavored egg and meat. It is additionally used broadly for laboratory researches due to the fact of its small physique size, speedy generation turnover, resistance to illnesses and high egg production [17]. It has been regarded as an appropriate model for poultry research [28]. From the phylogenetic factor of view, the JQ is intently related to the poultry [26]. Both (poultry and quail) have comparable karyotypes of  $2n=78$  chromosomes and a genome length of  $1.2 \times 10^9$  base pair (bp), consisting of morphologically distinct macro chromosomes (1–8 and the ZW sex chromosomes) and cytologically indistinguishable micro chromosomes [22]. Conservation genetics for preservation of species has acquired increasing interest in the current years [7, 10]. Molecular markers are very beneficial to learn about of populace structure and gene drift on characteristics of economic importance, particularly characteristics that are challenging to select for on the field.

During the past decades, molecular genetics can be applied with classical breeding in various farm animals which include poultry. DNA markers are effective tools in characterization and estimation of relatedness between genotypes. The estimation of genetic variability of a species is an important for its conservation and genetic improvement [5] Mazandaran, Iran. Venous blood samples were collected from 100 birds of both sexes. The RAPD-PCR technique was applied to generate a DNA fingerprint of individuals. Initially, a total of 20 ten-nucleotide arbitrary primers were used but 14 of 20 primers revealed a pattern with scorable amplified bands. From a total number of 140 scored bands 63 (45%). Genetic variety research are undertaken to classify folks or populations; and has been accessed in farm animals via morphological, molecular or biochemical techniques. [9, 16, 20] showed that Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) techniques can be readily applied to different species. Therefore, the objective of current study was to determine the diversity and characterization among white, desert and brown local quail in Kurdistan Region of Iraq using RAPD-DNA marker technique.

## MATERIALS AND METHODS

This study was carried out in Grdarasha researches unit, under the supervision and regulations of ethic committee at college of agriculture, University of Salahaddin-Erbil. A total of 144 blood samples were collected from both male and female local quails (desert, brown and white). From each bird, 0.5 mL blood sample was taken. Blood samples were collected in an anti-coagulant Ethylene Diamine Tetra acetic Acid (EDTA) tube, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  (Thermo Electron Corporation, ULT2540, USA) until DNA extraction. DNA was extracted the blood sample of each bird using the DNeasy® blood kit (GeNet Bio. Laboratory Korea) according to the manufactures instructions. The DNA extracts of the blood samples belong to quail birds of the same line. The quantity of

DNA (purity and concentrations) has been measured by Thermo scientific NanoDrop™ spectrophotometer (NanoDrop® ND-1000). The quality of DNA was determined on a 1% agarose gel electrophoresis. Twenty RAPD primers were initially applied (TABLE I). Genetic parameters of total fragment numbers, size range of fragments, polymorphic fragment numbers, Nei's gene diversity, Nei's genetic identity, genetic distance and phylogenetic tree construction were calculated using the genetics software Genepop version 3.3 [18]. Amplifications were performed using a thermal Cycler (aBioRad thermocycler), with the final reaction volume of 25  $\mu\text{L}$ . Each reaction volume contained: 12.5  $\mu\text{L}$  of Green Master Mix (0.5mM of each dNTP in 10 mM Tris-HCL, Ph 9.0, 4mM MgCl, enzyme stabilizer, loading dye and 1U Taq DNA polymerase), 2  $\mu\text{L}$  of of each RAPD primer, 4  $\mu\text{L}$  (40 ng) of DNA template and 6.5  $\mu\text{L}$  of DNase free water. The Polymerase Chain Reaction program used for Primer (OPA-14): programmed for 35 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes (min), annealing at  $34^{\circ}\text{C}$  for 0.30 min and extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 0.30 min. An initial denaturation step of 1 min at  $95^{\circ}\text{C}$  and a final extension step of 5 min at  $72^{\circ}\text{C}$  were included in the first and last cycles, respectively. for the (OPG-05 and OPA-20) used the above program with annealing temperature replaced to  $35^{\circ}\text{C}$  and for Primers (OPM-06, OPM-20, OPN-16, OPP-14, OPQ-03, OPQ-7 and OPS-01) annealing temperature was set at  $37^{\circ}\text{C}$  and 4th protocol for primers (OPA-04, OPB-01 and 10-MER) annealing temperature was  $42^{\circ}\text{C}$ . Amplified DNA fragments were separated electrophoretically in 1.5% agarose gel and stained with ethidium-bromide in an electrophoresis tank 1x Tris-borate EDTA buffer. The gel was visualized by a Ultraviolet (UV) illumination (Proxima 2500 Isogene Life science, Netherland).

## RESULTS AND DISCUSSION

Out of the twenty random primers, thirteen were amplified and showed bands. Twelve of the thirteen primers were polymorphisms and one primer were monomorphism in the local quails FIG. 1. The total fragment number (TFN) for the 13 primes was 310 fragments, ranged from 10 fragments in 10 MER to 30 fragments in OPG-05 and OPP-04 with fragments size ranged from 250 to 2800 bp (TABLE II). Similar results were reported [21] in six quail lines the number of bands ranged from 7 to 13 with size range of 250 to 4000 bp. While Eissa and Mahmoud [6] showed that the number of amplified DNA fragments ranging from 4-11. Karabag, and Balcioglu, [13] reported that the number of amplified bands ranged from 4 to 14 with band size ranged from 150 to 2600 bp. in quail lines. The highest total numbers of bands were recorded in white (male and female), while the lowest were showed in brown female (TABLE II).

The overall polymorphic fragments number (PFN) was 34, were obtained out of 310 TFN from 13 primers (TABLE III). The highest PFN found at locus OPA-04 which had 4 bands, whereas the lowest PFN found at locus OPA-14, OPM-06, OPN-16, OPQ-07 and 10-MER was 1band. These results were in range with that reported [21] found that the percentage of polymorphic was

*TABLA I*  
**NAME, SEQUENCES AND GC % OF ALL PRIMERS USED**

No.	Primer Name	Sequence (5' - 3')	GC Content %	References
1	OPA-04	AATCGGGCTG	60	
2	OPA-14	TCTGTGCTGG	60	
3	OPB-07	GGTGACGCAG	70	[24 ]
4	OPB-19	ACCCCCGAAG	70	
5	OPG-03	GAGCCCTCCA	70	
6	OPG-05	CTGAGACGGA	60	
7	OPA-20	GTTGCGATCC	60	
8	OPB-01	GTTTCGCTCC	60	
9	OPB-12	CCTTGACGCA	60	[23]
10	OPC-02	GTGAGGCGTC	70	
11	OPC-13	AAGCCTCGTC	60	
12	OPM-05	GGGAACGTGT	60	
13	OPM-06	CTGGGCAACT	60	
14	OPM-20	AGGTCTTGGG	60	[3]
15	OPN-16	AAGCGACCTG	60	
16	OPP-04	GTGTCTCAGG	60	
17	OPQ-03	GGTCACCTCA	60	[12]
18	OPQ-07	CCCCGATGGT	70	[2]
19	OPS-01	CTACTGCGCT	60	[25]
20	10 MER	AACGCGCAAC	60	[4]

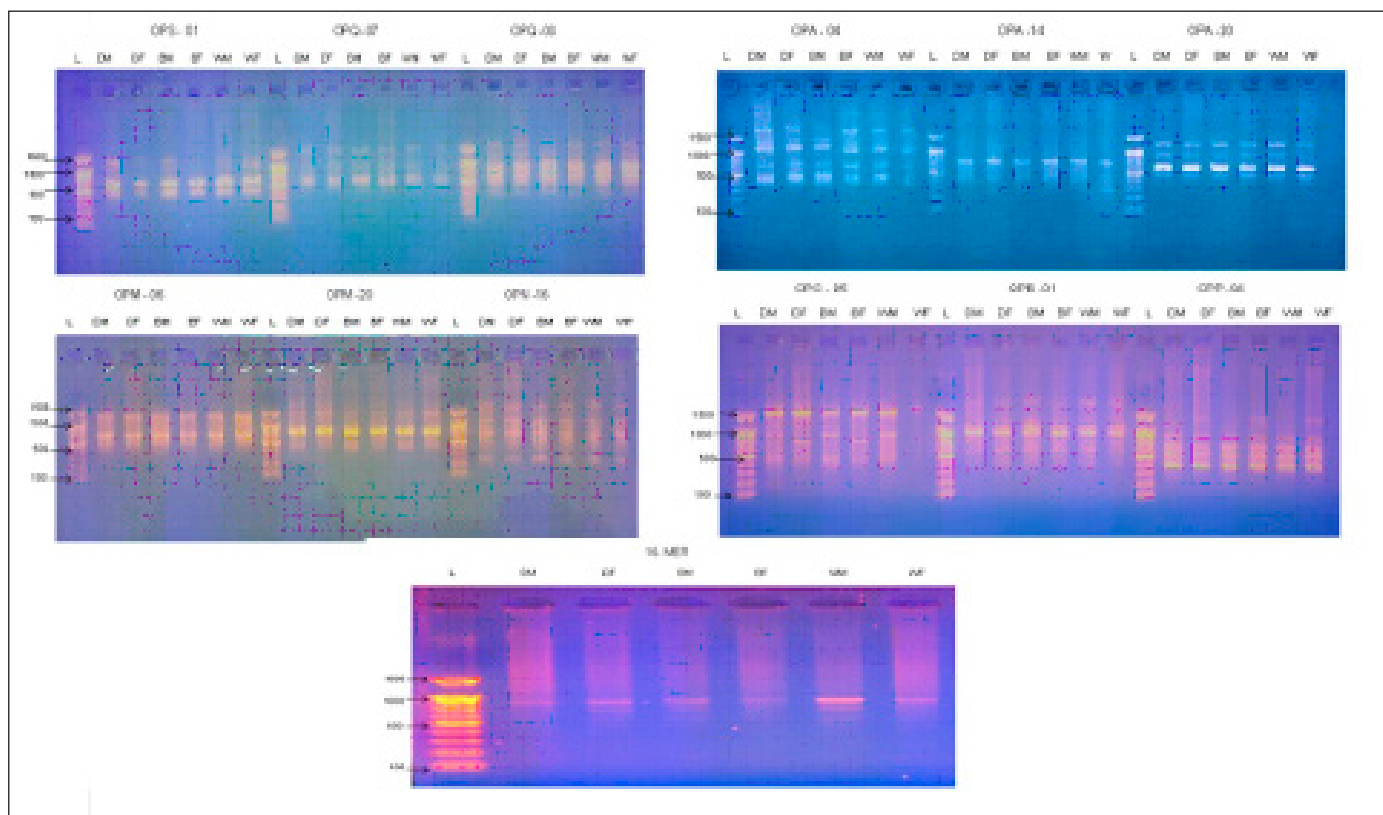
31.7% (19 bands) among the quail lines, and disagree with that detected 6, 13-15 Out of the 310 bands, 2 of them were unique bands (TABLE IV). The unique bands were obtained from OPQ-07 and OPB-01 locus in local brown breed with band size 1350 and 1500 bp, respectively.

The values of Nei's gene diversity (gene diversity / heterozygosity) overall quail lines averaged 0.1026. This result indicated the genetic diversity among local quails is moderately low. As in the (TABLE III) revealed that out of 13 amplified primers only one was monomorphism, the rest gives heterozygosity, the OPM-06, OPN-16 and OPQ-07 loci give highest heterozygosity were 0.444. Such results indicate possibility of using these loci more than others one in future studies. Similarly, [19] showed that the Nei's gene diversity were 0.3412, 0.2753, 0.2045, 0.3556 and 0.3200 for five populations of quails (Japanese, Fawn, Dhakaya, White and Rosetta), respectively. The genetic similarity among quail lines with a heterozygosis value was (0.125) [13]. The Shannon diversity index value in present study was 0.1469 for all over samples, (TABLE V).

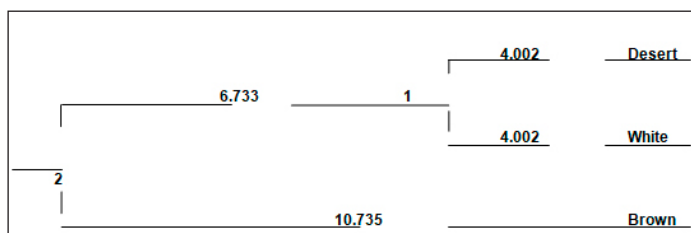
Genetic distances among the studied three local quails were shown in TABLE VI. The genetic distances ranged from 0.262 between desert and brown. On the other hand the lowest distance 0.080 recorded between desert and white. The population pair white and desert showed higher genetic identity (0.9231) than

other population pairs. Similar results were reported [19] in five population of quails namely Japanese, Fawn, Dhakya, White and Rosetta which the genetic distances value arrived 0.0675, 0.1138, 0.2088 and 0.0938 respectively among population.

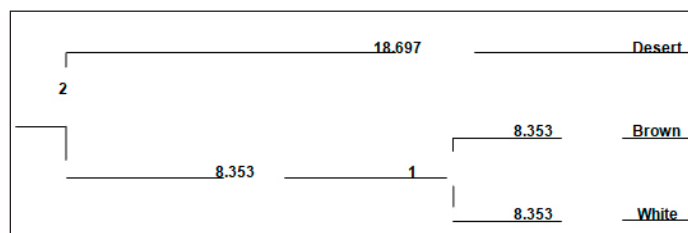
The data obtained from the analysis of RAPD were used to draw precise relationships among the three local quail lines, and the resultant dendrograms are shown in FIG. 2 (A, B and C). Dendrograms of phylogenetic relationships were constructed based on the genetic similarity indices. Cluster analysis was conducted to generate a dendrograms illustrating possible relationships among the studied three quail lines based on molecular attributes. The overall dendrograms clustered the quail lines into two clusters (groups). The first group consisted of White males and females were delimited in separate group form one cluster from the rest of studied quail lines males and females. Desert line males and females, and brown line males and females were delimited in other separate group form another cluster. The overall genetic distance among local quails ranged from 0.040 to 0.107, the lowest genetic distance was recorded between the desert and white line, at 0.040. On the other hand, the highest genetic distance (0.107) was observed in brown line. The female and male dendrograms FIG. 2 (A and C) were exactly similar to the overall dendrograms FIG. (1 A) in the phylogenetic relationships, but different in the distances between breeds because in female dendrogram FIG. (2 B) the longest distance was (0.276) observed



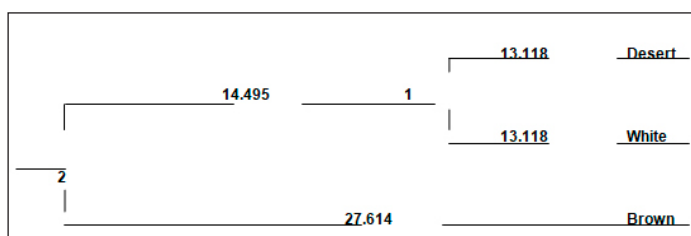
**FIGURE 1. GEL ELECTROPHORESIS FOR THIRTEEN RAPD PRIMERS IN STUDIED LOCAL QUAIL BREDS (DM= desert male, DF= desert female, BM= brown male, BF= brown female, WM= white male, WF = white female)**



**FIGURE (2A). UPGMA DENDOGRAMS SHOWING DIFFERENTIATION AMONG THE THREE LOCAL QUAILS**



**FIGURE (2C). UPGMA DENDOGRAMS SHOWING DIFFERENTIATION AMONG THE THREE LOCAL QUAILS (MALE)**



**FIGURE (2B). UPGMA DENDOGRAMS SHOWING DIFFERENTIATION AMONG THE THREE LOCAL QUAILS (FEMALE)**

in Brown female line, whereas the smallest distance was (0.131) between the desert and white, While in the male dendrogram FIG. (2 C) show the highest genetic distance in desert line was (0.187), thus, lowest genetic distance was (0.084) recorded between the brown and white line.

Furthermore, these results were lower than that reported [19] in five quail strains. Moreover, the result showed that there were various genetic distances among studied quail breeds [1] indicating little genetic differentiation between the brown and the white quail was 0.0534, but [28] reported that the genetic identity (0.991) between white and brown quails are clustered into two clusters (groups), the 1st group included of desert lines, while, the 2nd cluster included the brown and white lines. Furthermore, these results were lower than that reported [19] in five quail strains. Moreover, the result showed that there were various genetic distances among studied quail breeds [1] indicating little genetic differentiation between the brown and the white quail was 0.0534 but [27] reported that the genetic identity (0.991) between white and brown quails.

TABLE II  
BAND NUMBER AND FRAGMENTS SIXZE (BP) IN LOCAL QUAILS

No.	Primers name	Desert						Brown						White						Overall			
		Male		Female		Male		Female		Male		Female		Male		Female		Male			Female		
		No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp	No. of band	Size range bp		No. of band	Size range bp	Total No. of band
1	OPA-04	5	450-2000	5	450-2000	4	450-1350	5	450-2000	5	450-2000	5	450-2000	5	450-2000	5	450-2000	5	450-2000	5	450-2000	29	450-1800
2	OPA-14	3	400-750	4	400-750	3	400-750	3	400-750	3	400-750	3	400-750	4	400-750	4	400-750	4	400-750	4	400-750	21	350-750
3	OPA-20	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	4	500-1250	24	500-1250
4	OPM-06	5	400-1400	4	500-1400	5	400-1400	4	500-1400	4	500-1400	4	500-1400	5	400-1400	5	400-1400	5	400-1400	5	400-1400	28	400-1400
5	OPM-20	4	450-2000	3	600-2000	3	450-1500	2	600-1500	4	450-2000	4	450-2000	4	450-2000	4	450-2000	4	450-2000	4	450-2000	20	450-2000
6	OPN-16	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	5	250-2000	29	250-2000
7	OPS-01	3	400-1400	3	400-1400	3	400-1400	2	400-700	3	400-1400	3	400-1400	3	400-1400	3	400-1400	3	400-1400	4	400-1400	18	400-1400
8	OPQ-07	3	700-2000	3	700-2000	3	700-2000	4	700-2000	4	700-2000	4	700-2000	3	700-2000	3	700-2000	3	700-2000	3	700-2000	19	700-2000
9	OPQ-03	5	600-1800	4	600-1800	4	600-1300	5	600-1800	5	600-1800	5	600-1800	5	600-1800	5	600-1800	5	600-1800	5	600-1800	28	600-1800
10	OPG-05	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	5	450-1800	30	450-1800
11	OPB-01	4	400-2800	4	400-2800	5	400-2800	3	450-1300	4	400-2800	4	400-2800	4	400-2800	4	400-2800	4	400-2800	4	400-2800	24	400-2800
12	OPP-04	5	350-1300	5	350-1500	5	350-1300	6	350-1500	4	350-1500	4	350-1500	6	350-1500	4	350-1500	4	350-1500	5	350-1500	30	350-1500
13	10 MER	1	900	2	600-900	2	600-900	2	600-900	2	600-900	2	600-900	2	600-900	2	600-900	1	900	1	900	10	600-900
	Total	52	250-2800	51	250-2800	51	250-2800	50	250-2000	53	250-2800	53	250-2800	53	250-2800	53	250-2800	53	250-2800	53	250-2800	310	250-2800

TABLE III  
UNIQUE BAND NUMBER AND FRAGMENTS SIZE (BP) IN LOCAL QUAILS

No.	Primers name	Desert						Brown						White						Overall			
		Male		Female		Male		Female		Male		Female		Male		Female		Male			Female		
		No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp	No. of Unique band	Fragment Size bp		No. of Unique band	Fragment Size bp	Total No. of Unique band
1	OPQ-07	0	-	0	-	0	-	1	1500	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	1500
2	OPB-01	0	-	0	-	1	1350	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	1	1350
	total	0	-	0	-	1	1350	1	1500	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	2	1350-1500

TABLE IV  
TOTAL NUMBER OF FRAGMENTS, NUMBER AND PERCENTAGE POLYMORPHIC  
FRAGMENT FOR THIRTEEN PRIMERS USED

No.	Primer name	Total no. of fragment	No. of polymorphic fragment	% of polymorphic fragment
1	OPA-04	6	4	66.7
2	OPA-14	4	1	25
3	OPA-20	4	0	0
4	OPM-06	5	1	20
5	OPM-20	5	2	40
6	OPN-16	5	1	16.667
7	OPS-01	4	2	50
8	OPQ-07	4	1	25
9	OPQ-03	5	2	40
10	OPG-05	5	2	40
11	OPB-01	5	2	40
12	OPP-04	6	2	33.333
13	10 MER	2	1	50
<b>Mean</b>		<b>4.615</b>	<b>1.692</b>	<b>34.359</b>

TABLE V  
OVERALL ESTIMATION OF NUMBER OF ALLELES, EFFECTIVE NUMBER OF ALLELES,  
NEI'S GENE DIVERSITY AND SHANNON'S INFORMATION INDEX FOR LOCAL QUAIL BREEDS

No.	Primer name	na <sup>1</sup>	ne <sup>2</sup>	h <sup>3</sup>	I <sup>4</sup>
1	OPA-04	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
2	OPA-14	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
3	OPA-20	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
4	OPM-06	2.0000	1.8000	0.4444	0.6365
5	OPM-20	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
6	OPN-16	2.0000	1.8000	0.4444	0.6365
7	OPS-01	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
8	OPQ-07	2.0000	1.8000	0.4444	0.6365
9	OPQ-03	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
10	OPG-05	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
11	OPB-01	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
12	OPP-04	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
13	10 MER	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
<b>Mean</b>		<b>1.2308</b>	<b>1.1846</b>	<b>0.1026</b>	<b>0.1469</b>
<b>St. Dev</b>		<b>0.4385</b>	<b>0.3508</b>	<b>0.1949</b>	<b>0.2791</b>

na<sup>1</sup> overall observed number of alleles.

ne<sup>2</sup> overall effective number of alleles.

h<sup>3</sup> overall Nei's gene diversity.

I<sup>4</sup> overall Shannon's information index

TABLE VI  
NIES GENEYIC IDENTITY (ABOVE DIAGONAL)  
AND GENETIC DISTANCE (BELOW DIAGONAL)  
AMONG LOCAL QUAILS

Pop ID	Desert	Brown	White
Desert	***	0.7692	0.9231
Brown	0.2624	***	0.8462
White	0.08	0.1671	***

## CONCLUSION

The data obtained from the lines included in this study are of great importance to the quail holders in Kurdistan Region – Iraq. The percentages of polymorphism (20 to 50%), the Nei's gene diversity (heterozygosity) and Shannon diversity index value averaged 0.1026, and 0.1469, respectively. The genetic distance (10.735 to 27.614) among three different quail colors found in this study indicates that these quail have the required amount of genetic variation to made genetic improvement in this type of bird in near further. This study helps us to clarify the image of the genetic diversity of the local Iraqi quail in and the breeders can used it for mating system when need to make the crossing among these quails

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] ADEBUKOLA, A. A.; OSAMEDE, H.O.; MABEL, O.A. Genetic variation of the Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) based on biochemical polymorphism. **Biotech. Anim. Husb.** 33 (3): 321-332. 2017.
- [2] AJIT, P.; PRIYADARSHANI, Y.; MORE, V.; BHUSAHEB, G.; KUMARA, S. M. Molecular characterization of cluster bean (*Cyamopsis tetragonoloba*) cultivars using PCR-based molecular markers. **Inter. J. of Ad. Biotec. Res.** 4(1):158-166. 2013.
- [3] AMMEN, Q. A. A study of some quantitative and molecular characteristics of local turkey (*Meleagris gallopavo*) in Kurdistan. PhD. Dissrtation. Faculty of Agriculture Science, University of Sulaimani. KRG. Iraq. 50 pp. 2013.
- [4] CHASSIN-NORIA, O.; LOPEZ-ZAVALA, R.; CANO-CAMACHO, R.; SUAREZ-CORONA, E.; JUAREZ-CARATACHEA, A.; ZAVALA-PARAMO, Ma. G. Genetic diversity and similarity between domestic Mexican turkey *Meleagris gallopavo* populations based on random amplification polymorphic DNA (RAPD). **Tec. Pec. Mex.** 43 (3): 415-424. 2005.
- [5] CRAWFORD, R.D. Origin and history of poultry species. **Poultry breeding and Genetics.** 41 pp. 1990.
- [6] EISSA, E.A.; MAHMOUD, B.Y. Characterization of selected Japanese Quail and randombred control lines in the 4 th generation based on productive performance and RAPD-PCR analysis. **Poult. Egypt J. Sci.** 34 (4): 869-893. 2014.
- [7] FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. **C. R. Biol.** 326: 22–9. 2003.
- [8] GODRAT, R.; ALIREZA, K.; ARDESHIR, N.J.; SAEID, S. Evaluation of genetic variability in a breeder flock of native chicken based on randomly amplified polymorphic DNA markers. **Iran J. Biotechnol.** 3 (4): 231–234. 2005.
- [9] GONCALVES, L.S.A.; RODRIGUES, R.; SUDRE, C.P.; BENTO, C.S.; MOULIN, M.M.; ARAUJO, M.L.; DAHER, R.F.; PEREIRRA, T.N.S.; PEREIRA, M.G. Divergência genética em tomate estimada por marcadores RAPD em comparação com descritores multi categóricos. **Hortic Bras.** 26 (3): 364–70. 2008.
- [10] GORDON, H. L.; SALLY, N. A.; FRED, W. A. **Conservation and the genetics of populations.** 2nd Ed. Malden. 642 pp. 2012.
- [11] HOWES, J.R. Japanese Quail as found in Japan. **A News Biomed Res. Work.** 1:19–30. 1964.
- [12] IVIGIN, R.; BILGEN, G. Estimation of genetic distance in meat and layer pure lines using randomly amplified polymorphic DNA. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.** 26:1117-1120. 2002.
- [13] KARABAG, K.; BALCIOGLUB, M. S. Genetic diversity among selected Japanese Quail (*Coturnix coturnix japonica*) lines using RAPD markers. **J. Appl. Anim. Res.** 38:1, 149-152. 2010.
- [14] KUMAR, K.G.; KUMAR, S.; AHLAWAT, S.P S.; KUMAR, P.; SINGH, R.K.; BISHT, G.S. Randomly amplified polymorphic DNA markers in genetic analysis of relatedness in Japanese quail lines. **Indian J. Anim. Sci.** 70 (6): 604-7.2000.
- [15] MANSOUR, A.; TEIXEIRA, J.A. Molecular markers associated with the development of new phenotypes of Japanese Quail in Egypt. **Global Sci. Books.** 4 (1): 79-84. 2010.
- [16] MOHAMMADI, S.A.; PRASANNA, B.M. Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. **Crop Sci.** 43(4):1235–48. 2003.
- [17] PADGETT, C.A.; LVEY, W.D. *Coturnix* Quail as a laboratory **Res. Anim. Sci** (30): 267- 268. 1959.
- [18] RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (Version 1.2): Population genetics software for exact tests and mcumenicism. **J. Hered.** 86 (3): 248–9. 1995.
- [19] SHAMIM, I. Study on the genetic diversity in different population of Quail using Randomly amplified polymorphic DNA markers. Bangladesh Agricultural University. **Thesis of Grade.** pp 37. 2012.
- [20] SHARMA, D.; APPA-RAO, K.B.C.; SINGH, H.P.; TOTEY, S.M. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for evaluating genetic relationships among varieties of guinea fowl. **Genet. Anal. Biomol. Eng.** 14 (4): 125–8. 1998.

- [21] SHARMA, D.; SINGH, D.P.; SINGH, R. V. Polymorphism in indigenous poultry germplasm detected through randomly amplified polymorphic DNA. **J. Appl. Anim. Res.** 18 (1):115–120. 2000.
- [22] SHIBUSAWA, M.; MINAI, S.; NISHIDA, C.; SUZUKI, T.; MANO, T.; YAMADA, K.A. Comparative cytogenetic study of chromosome homology between chicken and Japanese quail. **Cytogenet. Cell Genet.** 95(1-2):103-109. 2001.
- [23] SMITH, E.J.; GENG, T.; LONG, E.; PIERSON, F.W.; SPONENBERG, D.P.; LARSON, C.; GOGAL, R. Molecular analysis of relatedness of five domesticated turkey strains. **Biochem. Genet.** 43(1-2): 35-47. 2005.
- [24] SMITH, E.J.; JONES, C.P.; BARTLETT, J.; NESSTOR, K.E. Use of randomly amplified polymorphic DNA markers for the genetic analysis of relatedness and diversity in chickens and turkeys. **Poult. Sci.** 75(5):579–584. 1996b.
- [25] SRIVASTAVA, P.; PANDEY, A.; SINHA, D.P. Genetic diversity analysis in different varieties of black gram using RAPD markers. **J.Plant. Breed. Crop Sci.** 3(3): 53-59. 2001.
- [26] STOCK, A.D.; BUNCH, T.D. The evolutionary implications of chromosome banding pattern homologies in the bird order Galliformes. **Cytogenet Genome. Res.** 34(1-2):136–48. 1982.
- [27] TUBELYTE, V.; BUTKAUSKAS, D.; PAULAUSKAS, A.U.; SRUOGA, A. Variability of Blood Serum Proteins in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) Breeds and Hybrids. **Acta. Zool. Litu.** 10 (4): 106-110. 2000.
- [28] WILSON, W.O.; ABBOTT, U.K.; ABPLANALP, H. Evaluation of Coturnix (Japanese Quail) as pilot animal for poultry. **Poult. Sci.** 40 (3): 651–657. 1961.

# TIPOLOGÍAS Y ANÁLISIS GEOESPACIAL DE LA PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EL MUNICIPIO LAS TUNAS, CUBA

## Typography And Geospatial Analysis The Sheep Production In The Municipality The Tunas, Cuba

Javier Antonio Herrera<sup>1</sup> -Toscano y Oscar<sup>2</sup> Carmenate - Figueredo.

1 Instituto de Ciencia Animal, 2 Facultad de Ciencias Técnicas y Agropecuarias. Universidad de las Tunas Cuba.

Email: Jherrera@ica.co.cu

### RESUMEN

El objetivo de la investigación fue tipificar y analizar geoespacialmente los escenarios de producción de ovinos del municipio de las Tunas, Cuba y su periferia, como paso previo a la implementación de un Programa de Transferencia Tecnológica. Se analizaron 68 variables (22 cuantitativas y 46 cualitativas) del comportamiento productivo y reproductivo, del manejo, alimentación, estructurales, sociales y edafoclimáticas de 49 escenarios productivos. Con las variables de mayor poder discriminante resultantes de los análisis previamente realizados, componentes principales ordinarios y componentes principales categóricos, se ejecutaron de manera iterativa varios análisis de conglomerados jerárquicos hasta llegar a la mejor clasificación posible. Se validaron los resultados del análisis de conglomerados con las pruebas Ji cuadrado de Pearson, para las variables cualitativas y análisis de varianza en las cuantitativas. El proceso de conglomeración rindió los mejores resultados con la formación de cuatro tipos de fincas. La ubicación geoespacial de las fincas, según los resultados del análisis de conglomerado indicó que, la mayoría de estas se encontraron en las zonas suburbanas y rurales. En cuanto a la existencia de cuerpos de aguas superficiales, las imágenes revelaron que cuatro escenarios estuvieron próximos a embalses con alguna importancia. El proceso de investigación que se desarrolló permitió definir cuatro tipologías de fincas en el municipio de las Tunas, Cuba y su periferia, con diferencias notables en la cantidad de animales, indicadores productivos, aspectos de manejo - alimentación y sociales. Por otra parte, el análisis geoespacial facilitó la visualización desde una panorámica diferente y amplia, las características de la zona investigada. Se demostró que la complementación de ambas herramientas constituye una alternativa eficaz en el análisis de sistemas productivos agropecuarios, que puede ser útil como paso previo a la implementación de Programas de Transferencia Tecnológicas.

**Palabras clave:** Ovinos; variables; fincas; análisis de conglomerados; análisis geoespacial

### ABSTRACT

The objective of the research was to typify and analyze geospatially the sheep production scenarios of the Municipality of Las Tunas, Cuba and its periphery, as a previous step to the implementation of a Technology Transfer Program. Sixty eight, variables (22 quantitative and 46 qualitative) of productive and reproductive behavior, management, food, structural, social and edaphoclimatic of 49 productive scenarios were analyzed. With the variables with the highest discriminating power resulting from the previously performed analyzes, ordinary main components and categorical main components, several hierarchical cluster analyzes were iteratively executed until reaching the best possible classification. The results of the cluster analysis were validated with Pearson's Chi-square tests for the qualitative variables and analysis of variance in the quantitative ones. The conglomeration process yielded the best results with the formation of four types of farms. The geospatial location of the farms, according to the results of the cluster analysis indicated that, most of these were found in suburban and rural areas. Regarding the existence of surface water bodies, the images revealed that four scenarios were close to reservoirs of some importance. The research process that was developed allowed to define four types of farms in the Municipality of Las Tunas, Cuba and its periphery, with notable differences in the number of animals, productive indicators, management aspects - food and social. On the other hand, the geospatial analysis facilitated the visualization from a different and wide view, the characteristics of the investigated area. It was demonstrated that the complementation of both tools constitutes an effective alternative in the analysis of agricultural production systems, which can be useful as a previous step to the implementation of Technology Transfer Programs.

**Key words:** Sheep; variables; ranches; cluster analysis; geospace analysis



## INTRODUCCIÓN

En la gestión de los sistemas agrícolas o pecuarios se han utilizados diversos métodos, enfoques y perspectivas, con ventajas y desventajas. Sin embargo, el advenimiento de la estadística multivariada en la actividad científica representó un avance significativo para el análisis de sistemas complejos. En este sentido el análisis de conglomerados es una de las técnicas más utilizadas.

El análisis de conglomerado es un método de clasificación que consiste básicamente en estratificar un conjunto de individuos en función de determinadas características o variables, con el objetivo de minimizar las diferencias entre individuos de un mismo grupo y maximizar las diferencias entre los grupos formados [1].

En el campo de la investigación de sistemas agropecuarios múltiples son los ejemplos de la utilización de dicha técnica con la cual se han diseñado estrategias de intervención tecnológica, proyectos de investigación o desarrollo, entre otros. En este campo, una clasificación adecuada de los sistemas de finca permite: seleccionar grupos y fincas representativas, entre otros aspectos [4, 5].

La información anterior permite comprender que el análisis clúster tiene una extraordinaria importancia en la investigación científica y en cualquier rama del saber, debido a que el propósito de la misma es, en varias ocasiones, la clasificación "per se".

Por otra parte, es importante combinar las técnicas anteriormente señaladas con el análisis geoespacial [9]. En este sentido, muchas entidades usan el análisis espacial para tomar decisiones tal es el caso del ámbito agropecuario, donde se perfila como herramienta importante en tareas complejas como: monitoreo de la expansión agrícola sobre diferentes suelos y agro-ecosistemas, clasificación de usos de suelo y estimación de área sembrada, mapeo de aptitud potencial de los suelos y evaluación de riesgos, información y planificación de la agricultura y ganadería, explotación forestal, evaluación de daños en áreas forestadas y detección de cambios y monitoreo, efectos de los cambios globales y regionales, reconocimiento de daño en las forestaciones [3], entre otras tareas importantes. Lo anterior resume la enorme aplicación del análisis espacial en la gestión agropecuaria por lo cual puede constituir una herramienta pertinente para el análisis de los datos geoespaciales asociados a procesos de tipificación.

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue tipificar y analizar geoespacialmente los escenarios de producción de ovinos (*Ovis aries*) del municipio de las Tunas, Cuba y su periferia, como paso previo a la implementación de un Programa de Transferencia Tecnológica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización y período:** La investigación se realizó en el

municipio Las Tunas, provincia Las Tunas, Cuba, situado en la latitud: 20° 57' 25" N, Longitud: 76° 57' 13" O, con una altitud de 90 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.). El período analizado estuvo comprendido entre los años 2016 y 2017.

**Clima:** El comportamiento promedio de las principales variables climáticas en la etapa mostró valores de precipitación pluvial de 700 milímetros (mm), temperatura 28°C y 76 % de humedad relativa.

**Recopilación de la información:** La información se recabó a nivel de rebaño, con los diagnósticos realizados en las áreas productivas en cada finca. Se analizaron indicadores del desempeño productivo, reproductivo, de manejo, alimentación, estructurales, sociales y condiciones edafoclimáticas de 49 escenarios productivos, que representó el 58 % del total.

**Variables:** Se examinaron 68 variables: 22 cuantitativas y 46 cualitativas.

**cuantitativas:** años de experiencia, área agrícola, área con forraje, cantidad de cuarterones, cantidad de instalaciones, cantidad de productores, corderos destetados, corderos vendidos, edad de los animales, edad promedio de los productores, humedad relativa promedio, mortalidad, mujeres, nacimientos totales, número total de animales, peso de venta o ceba, precipitaciones anuales acumuladas, promedio anual de capacitaciones, reproductoras gestantes, temperatura promedio, tiempo de pastoreo diario y total de reproductoras.

**cualitativas:** relieve, acuartonamiento, afiliación, castración, cercado perimetral, cercanía de la vivienda respecto a la finca, comercio, condición de las instalaciones, condiciones de la vivienda, condiciones de las vías de acceso, conformidad con los precios de venta, crédito, destino de la producción, disponibilidad de agua, disponibilidad de electricidad, disponibilidad de maquinaria, equipo para moler, existencias de controles, fuentes de agua en la finca, genotipo predominante, grado en que la producción de ovinos cubre sus necesidades, intermediarios, losa sanitaria, manejo de residuales, manejo diferenciado de las categorías, nivel educacional, organización, otras especies, período de monta, presencia de árboles en el pastoreo, prioridad de la actividad ovina, producción agrícola, producción pecuaria, recursos locales, relieve, sacrificio de hembras, sistema de monta, sujeto a contratos, suplementación, tiempo disponible, tipo de instalaciones, tipo de mano de obra, tipo de pastoreo, tipo de suelo, tipo de vías de acceso, utilización de heno y silo y venta de los animales.

**Análisis de conglomerados:** con las variables de mayor poder discriminante resultantes de los análisis previamente realizados, componentes principales ordinarios y componentes principales categóricos, se ejecutaron de manera iterativa varios análisis de conglomerados jerárquicos hasta llegar a la mejor clasificación posible con las pautas propuestas por Hair [8]: método de aglomeración Ward, medida de distancia euclídea al cuadrado,

*TABLA I*  
**PAUTAS DEL PROCESO DE CATEGORIZACIÓN DE LAS VARIABLES CUALITATIVAS**

Variable	Valores		
	1	2	3
Condición de la vivienda	En mal estado	Aceptable	En buen estado
Tipo de pastoreo	Nómada	Continuo	Rotacional
Formas de comercialización	Informal	Formal	
Prioridad de la actividad ovina	Secundaria	Primaria	

las variables fueron normalizadas. Se validaron los resultados del análisis de conglomerados con las pruebas Ji cuadrado de Pearson para las variables cualitativas y análisis de varianza en las variables cuantitativas. Las variables cualitativas fueron categorizadas según sugiere la TABLA I. Los datos se procesaron por medio del paquete estadístico SPSS versión 16.0 (Visauta 1998) [12]. La información geoespacial se obtuvo por medio de la aplicación OsmAnd versión 1.7.5 [10], la cual se usó para obtener las coordenadas exactas de las fincas. La imagen satelital del área se obtuvo con Google Maps [7].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proceso de conglomeración rindió los mejores resultados con la formación de cuatro tipos de fincas (FIG 1). En este sentido, las características más significativas promedio de cada tipología que deberán tomarse en cuenta para la implementación de acciones tecnológicas y de cualquier otra índole de cara a la sustentabilidad y rentabilidad en las fincas investigadas se centran en lo siguiente:

**Tipología I:** Se constituyó de 10 fincas y presentó el mejor comportamiento en cuanto a eficiencia reproductiva y cantidad de corderos destetados por año. Este conglomerado fue el de mayor experiencia de sus productores en la actividad ovina, no obstante, mostró deficiencias sustanciales en los aspectos de capacitación con total ausencia de actividades de adiestramiento directas con los productores. Desde el punto de vista cualitativo este grupo utilizó con alta frecuencia el pastoreo continuo, en 7 ocasiones. Las condiciones de la vivienda son por lo general aceptables. En el 80% de los predios, la comercialización de la producción generalmente se realizó de manera formal.

**Tipología II:** Se formó con 10 escenarios con los rebaños menos numerosos por lo que presentaron menor cantidad de nacimientos y corderos destetados promedio. Además, agrupó a los productores de menor experiencia en la labor con los animales. No obstante, fueron lo que mayor cantidad de capacitaciones recibieron en los últimos años. En cuanto al tipo de pastoreo el continuo y el rotacional presentaron valores muy parecidos de frecuencia 4 y 5, respectivamente. La totalidad de las viviendas se clasificaron como aceptables, la comercialización se realizó de manera informal en todos los casos y en la mayoría de las fincas, la actividad ovina fue implementada como una actividad

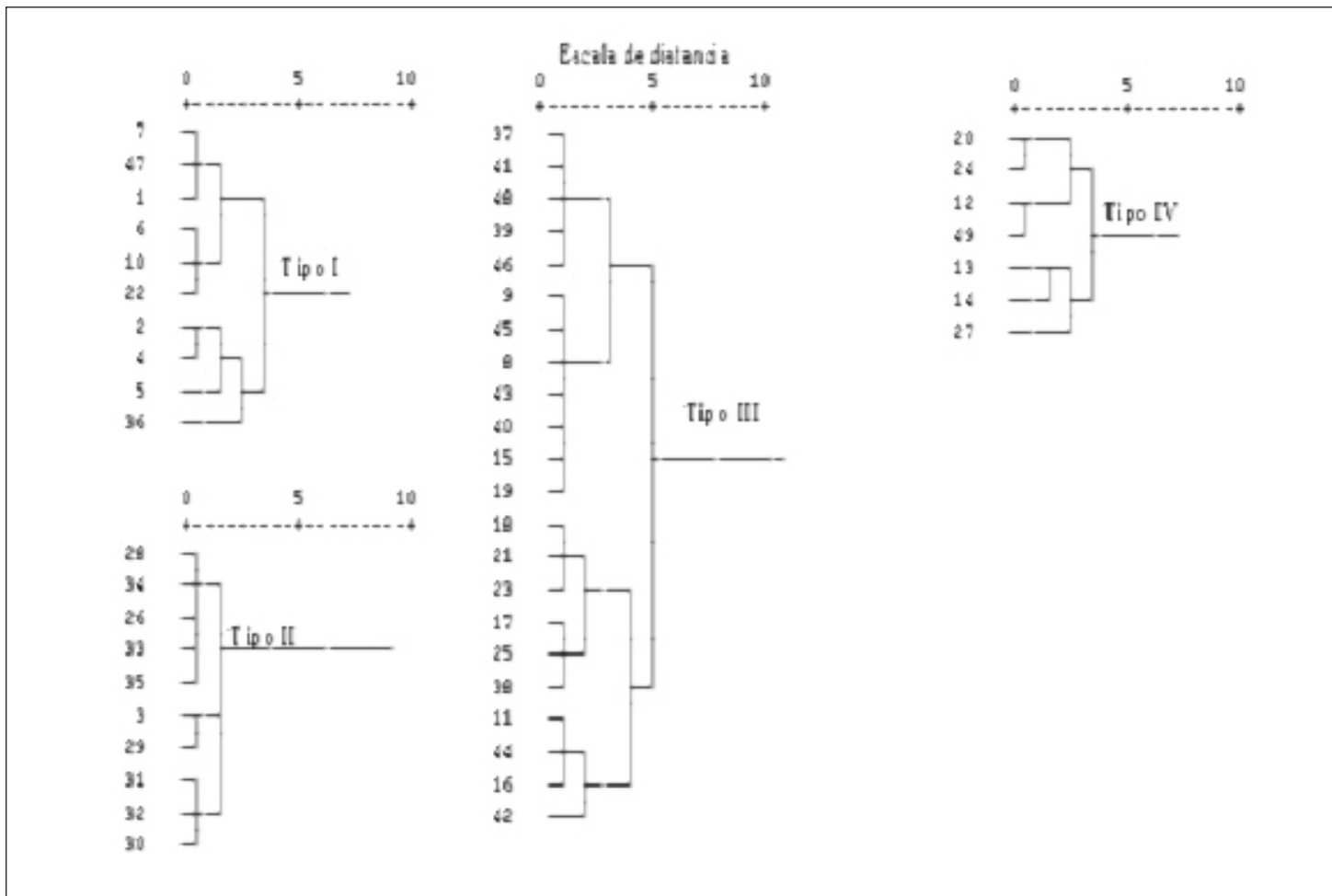
secundaria.

**Tipología III:** Fue el de más cantidad de predios, con pocos animales y el menor número de reproductoras. Fueron productores con un nivel aceptable de experiencia. Los indicadores en natalidad y corderos destetados fueron significativamente e inferiores a los conglomerados I y IV, con los valores más bajos de desempeño de las reproductoras. La capacitación fue nula en el período analizado, aunque la experiencia de los obreros fue una de las más elevadas entre todos los grupos. En cuanto al sistema de pastoreo todas las modalidades estuvieron representadas en este conglomerado, aunque la mayor frecuencia correspondió al continuo con (n=16), nómada (n=5) y el rotacional con (n=1) entidades, respectivamente. En el aspecto habitacional presentó viviendas entre aceptables y en buen estado, con los mayores porcentajes de estas últimas entre todos los conjuntos, factor importante en el rendimiento agropecuario en las comunidades campesinas [6]. En este grupo el 50 % de los productores que priorizan la producción ovina.

**Tipología IV:** Estuvo compuesto por 7 entidades con los rebaños más numerosos y de mayor cantidad de reproductoras de manera significativa. Sin embargo, se observó poca eficiencia reproductiva y bajo porcentaje de destete de los corderos. El tema de la capacitación fue marcadamente deficiente en concordancia con el resto de las tipologías a excepción de la II. Lo productores pertenecientes a este conglomerado presentaron aceptable nivel de experiencia en la actividad ovina. Cabe señalar que la mayor cantidad de productores pastorearon sus animales de forma itinerante (n=5). En este grupo se observaron viviendas de todo tipo en cuanto a su calidad, aunque la mayor frecuencia se presentó en las viviendas en aceptable estado (n=3) y el resto de las categorías con (n=2). La forma de comercialización fue mayoritaria la formal, del mismo modo la actividad fundamental fue la producción ovina.

### Validación de los resultados del análisis de conglomerado

Las TABLAS II y III muestran los resultados de la aplicación del análisis de varianza para las variables cuantitativas y el estadístico Ji cuadrado en las cualitativas, respectivamente. En este sentido se constató que, en 72 % de las variables que se emplearon en el proceso de conglomeración se detectaron al menos diferencias significativas, lo que evidenció el grado de



**FIGURA 1. ESQUEMA FRAGMENTADO DEL PROCESO DE AGLOMERACIÓN**

diferenciación que existió entre los grupos formados y el poder discriminante de las mismas. Este resultado demostró que el proceso de conglomeración es válido y da un adecuado valor práctico.

**Análisis geoespacial**

En la FIG. 2 se presenta la ubicación geoespacial de las fincas analizadas y agrupadas según los resultados del análisis de conglomerado. En tal sentido, se observó que la mayoría de las fincas se encontraron en las zonas suburbanas y rurales ya que, solamente el 10,20 % se ubicaron en el casco urbano de la ciudad, en cuyos casos prevaleció el pastoreo itinerante como característica distintiva, no obstante la mayoría se ubicó cerca de las vías de acceso, aspecto positivo de gran importancia en los procesos agropecuarios [11].

En cuanto a la existencia de cuerpos de aguas superficiales, las imágenes revelaron que apenas cuatro escenarios estuvieron próximos a embalses con alguna importancia, lo que indicó que no existió abundancia de disponibilidad de agua con esas características, lo que a su vez mostró que las fuentes de agua que se utilizaron y que pueden ser explotadas en mayor medida

por los productores son las subterráneas elemento, este que no coincidió con los reportes de investigaciones anteriores [2].

Por otro lado, esta herramienta satelital permitió reafirmar que la densidad de arborización fue baja, y que el relieve predominante fue el llano. En lo referente a la agrupación de las fincas se constató que, como tipología estuvieron dispersas en la mayoría de los casos, aunque este elemento no es significativo, ni dificulta la gestión de las mismas pues, el radio de acción fue aproximadamente de 32,71 kilómetros (km). Las imágenes además advirtieron que las fincas se encuentran cercanas entre ellas y que existe suficiente área para la producción agrícola y pecuaria.

**CONCLUSIONES**

El proceso de investigación que se desarrolló permitió definir cuatro tipologías de fincas en el municipio de las Tunas, Cuba y su periferia, con diferencias notables en la cantidad de animales, indicadores productivos, aspectos de manejo - alimentación y sociales. Por otra parte, el análisis geoespacial facilitó la visualización desde una panorámica diferente y amplia, las características de la zona investigada. Se demostró

**TABLA II**  
**COMPARACIÓN DE LAS TIPOLOGÍAS EN LAS VARIABLES CONGLOMERANTES CUANTITATIVAS**

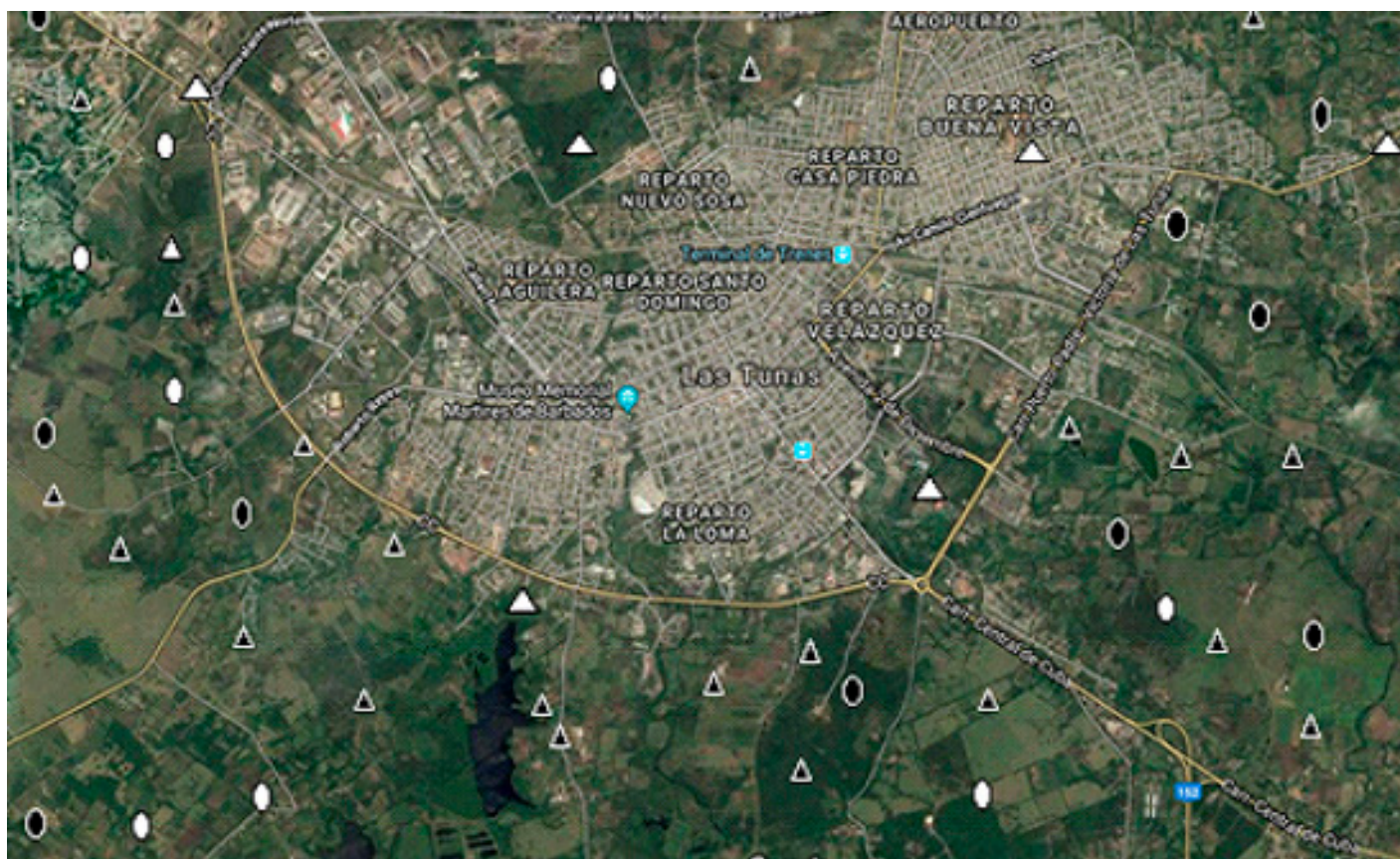
Variables	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Sig.
cuantitativas	n=10	n=10	n=22	n=7	
Total de animales	48,00 <sup>b</sup>	18,00 <sup>a</sup>	18,00 <sup>a</sup>	73,00 <sup>c</sup>	0,000
Total de reproductoras	26,10 <sup>b</sup>	12,60 <sup>a</sup>	8,59 <sup>a</sup>	44,71 <sup>c</sup>	0,028
Reproductoras gestantes	24,40 <sup>b</sup>	8,50 <sup>a</sup>	6,77 <sup>a</sup>	31,00 <sup>c</sup>	0,009
Nacimientos	46,60 <sup>b</sup>	9,90 <sup>a</sup>	8,77 <sup>a</sup>	33,86 <sup>b</sup>	0,043
Corderos destetados	36,00 <sup>c</sup>	6,90 <sup>a</sup>	7,36 <sup>a</sup>	19,57 <sup>b</sup>	0,040
Capacitaciones	0,00 <sup>a</sup>	2,00 <sup>c</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	0,890
Experiencia	24,30 <sup>b</sup>	9,70 <sup>a</sup>	14,95 <sup>ab</sup>	12,57 <sup>ab</sup>	0,777

a, b, c. letras distintas en la misma columnas indican diferencias significativas. P<0,05\*\* P<0,01\*\*\*

**TABLA III**  
**COMPARACIÓN DE LAS FRECUENCIAS EN LAS VARIABLES CONGLOMERANTES CUALITATIVAS POR TIPOLOGÍAS**

Variable cualitativas	Niveles	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	Sig.
		n=10	n=10	n=22	n=7	
Tipo de pastoreo	Nómada	0,00	2,00	10,20	10,20	0,003
	Continuo	14,28	10,20	32,65	2,04	
	Rotacional	6,12	8,16	2,04	2,04	
Condición de la vivienda	En mal estado	2,04	0,00	0,00	4,08	0,002
	Aceptable	12,24	20,40	16,32	6,1	
	En buen estado	6,12	0,00	28,57	4,08	
Formas de comercialización	Informal	4,14	20,40	26,53	2,04	0,004
	Formal	16,32	0,00	18,36	12,24	
Prioridad de la actividad ovina	Secundaria	18,36	14,28	22,44	2,04	0,130
	Primaria	2,04	6,12	22,44	12,24	

a, b, c. letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas. P<0,05\*\* P<0,01\*\*\*



**Leyenda: Tipología I (●); Tipología II (○); Tipología III (▲); Tipología IV (△)**

**FIGURA 2 IMAGEN SATELITAL DEL ÁREA INVESTIGADA Y UBICACIÓN GEOGRAFICA DE LAS FINCAS POR GONGLOMERADOS**

que la complementación de ambas herramientas constituye una alternativa eficaz en el análisis de sistemas productivos agropecuarios, que puede ser útil como paso previo a la implementación de Programas de Transferencia Tecnológica.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AZNAR, J.; BELMONTE, L.; VELASCO, J. Caracterización del cultivo del almendro en seco en Andalucía y propuestas de reconversión. **Rev. ITEA**. 112: 17-335. 2016.
- [2] DÍAS, A. El agua en Cuba: un desafío a la sostenibilidad. **Rev. Ingen. H idraul. Ambient**. 2: 46 – 59. 2018.
- [3] FUENZALIDA, M. La perspectiva del análisis espacial en la herramienta SIG: una revisión desde la geografía hacia las ciencias sociales. **Rev. Pers y Sociad**. 27: 33-52. 2013.
- [4] GARCÍA, J; IZQUIERDO, A; GONZÁLEZ, S; REYES, V; GÓMEZ, R; MALDONADO, J. Evaluación del impacto en la productividad y rentabilidad de la tecnología transferida al sistema de bovinos de doble propósito del trópico mexicano. **Trop. and Subtrop Agroec**. 21: 61-272. 2018.
- [9] JIJÓN, M. S; LARREA, C; BELMONT, P; BAROJA, C. Evaluación urbana del macrocentro de Quito (Ecuador) con indicadores basados en la entropía de Shannon, indicadores estadísticos clásicos y el análisis geoespacial. **Rev. Soc Argent. Estadist.** 11: 46 - 63. 2013.
- [10] OsmAnd versión android 1.7.5. Download OsmAnd+ Maps & Navigation 3.2.1 APK For Android, APK File Named And APP Developer Company Is OsmAnd . 2016.
- [11] PRETTY, J; SUTHERLAND, W; ASHBY, J; AUBURN, J. Las cien preguntas más importantes para el futuro de la agricultura global. **Rev. Intern.J. Agric.Sustat**. 9: 3 – 20. 2011.
- [12] VISAUTA, B. Análisis estadísticos con SPSS para Windows. Mc Graw – Hill interamericana de España, S.A.V. 2: Pp 358. 1998.

# SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN EL ALTIPLANO BOYACENSE, COLOMBIA-SURAMÉRICA

## Seroprevalence Of Bovine Brucellosis In The Boyacense Highlands, Colombia - South America

Roy José Andrade-Becerra<sup>1\*</sup>, MV, Esp, MSc, PhD; Julio Cesar Vargas-Abella<sup>2</sup>, Z, Esp, MSc y Luis Edgar Tarazona-Manrique<sup>3</sup>, eMVZ.

<sup>1</sup> Docente Titular Microbiología e Inmunología Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja, Colombia. <sup>2</sup> Docente asociado. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia. <sup>3</sup> MVZ. UPTC. Grupo de Investigación GIPATRACOL, Tunja (Boyacá-Colombia). \*Correspondencia: roy.andrade@uptc.edu.co

### RESUMEN

La brucelosis bovina es considerada como una de las enfermedades infecciosas más importantes en el mundo por sus implicaciones en salud pública. Para la investigación se tomaron muestras de 24.098 bovinos de 1.289 predios, se discriminaron como hembras de 18-35 meses (mes), hembras entre 36-59 mes, hembras mayores de 60 mes y machos. Se utilizaron como pruebas diagnósticas las técnicas Rosa de Bengala (RB), Fluorescencia Polarizada (FP), Elisa indirecto (Ei) y como prueba confirmativa Elisa Competitivo (Ec). De los 24.098 sueros procesados se encontró una prevalencia de brucelosis del 1,75%, que corresponden a 424 animales infectados y que se encuentran ubicados en las siguientes zonas: Occidente con 37,07%, seguida de la zona sur con 32,28%, la zona centro con 32,20%, la zona Oriente con 28,95 y la zona norte con 19,63%, confirmadas por Ec. Al separar las hembras por rangos de edad 24 a 35 mes, 36 a 59 mes y mayores de 60 mes se encontró que, a medida que aumenta la edad, en términos generales, la prevalencia se hace mayor. Se confirma la mayor sensibilidad y especificidad de la prueba EC comparada con las otras pruebas RB Modificada, RB Convencional, FP y Ei, pudiéndose detectar y diferenciar hembras vacunadas de infectadas

**Palabras clave:** Brucelosis bovina; Elisa; prevalencia

### ABSTRACT

Bovine brucellosis is considered one of the most important infectious diseases in the world due to its public health implications. For the investigation, samples were taken of 24,098 cattle of 1,289 farms, were discriminated as females of 18-35 months (mon), females between 36-59 mon, females over 60 mon and males. The Rose Bengal (RB), Polarized fluorescence (PF), Indirect Elisa (iE) and confirmatory Competitive Elisa (cE) tests were used as diagnostic tests. Of the 24,098 sera processed, a prevalence of brucellosis of 1.75% was found, corresponding to 424 animals infected and located in the following areas: West with 37.07%, followed by the southern zone with 32.28%, the central zone with 32.20%, the east region with 28.95 and the northern zone with 19.63%, confirmed by cE. When the females were separated by age ranges from 24 to 35 mon, 36 to 59 mon and over 60 mon, it was found that as age increases, in general terms, the prevalence becomes greater. The greater sensitivity and specificity of the cE test compared with the other modified RB, conventional RB, PF, and iE tests are confirmed, and it is possible to detect and differentiate vaccinated females from infected

**Key words:** Bovine brucellosis; Elisa; prevalence

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad producida por una bacteria del género *Brucella*, la cual comprende al menos 11 especies reconocidas, de acuerdo a su patogenicidad y preferencia por los hospedadores. En los bovinos (*Bos taurus*), la principal especie patogénica a nivel mundial es *Brucella abortus* [3,15]

Esta enfermedad es epidemiológicamente importante debido a que es una de las zoonosis más importantes a nivel mundial, por sus implicaciones en la salud pública, por su fácil transmisión a los humanos, debido a que se transmite en forma natural de los animales vertebrados al hombre, atentando contra la salud de los ganaderos y del personal de campo, así como de los consumidores de leche cruda de animales enfermos.

También es importante económicamente en el ámbito pecuario, entre sus implicaciones cabe destacar: la pérdida de terneros (abortos) en la segunda mitad de la gestación, placentitis y/o necrosis de placentomas, infertilidad subsecuente a la retención de placenta y a la metritis, repetición de servicios, aumento del intervalo entre partos, alta tasa de remplazos, disminución en la producción de leche y pérdida de peso en las canales, como también, orquitis y epididimitis en los machos, factores altamente importantes en sistemas de producción lecheros y/o cárnicos [2].

La repercusión socioeconómica de la brucelosis es grande en los países que no la han erradicado. En Colombia, las pérdidas económicas en bovinos no han sido calculadas en toda su extensión, sin embargo, en evaluaciones realizadas sugieren valores hasta de 15.000 dólares al año [12].

En la actualidad existen dos opciones para la vacunación contra la brucelosis bovina, la primera de ellas es Cepa 19, la cual genera una inmunidad de tipo humoral; y RB-51, la cual genera inmunidad de tipo celular; ambas mostrando una amplia efectividad contra la prevención de la infección y el subsecuente aborto, además ofreciendo amplio tiempo de protección [2].

La decisión sobre que pruebas usar en los programas de control y erradicación depende de la entidad oficial encargada en cada país; y está basada en estudios epidemiológicos de prevalencia y en los procesos de validación para conocer, tanto la repetitividad y la reproducibilidad, como la sensibilidad y especificidad de cada una de las pruebas disponibles, así como el tipo de vacunación utilizada en cada región. A nivel mundial, las pruebas utilizadas para el diagnóstico de brucelosis bovina son: Test de anillo en leche, Test intradérmico, Fijación del complemento, test de aglutinación sérica, rosa de bengala (RB), Elisa-indirecto (Ei), Elisa-competitivo (Ec) y Fluorescencia polarizada (FP) [4, 19, 21]. En Colombia, las pruebas diagnósticas aprobadas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) son la prueba RB, FP y Ei, usadas como prueba tamiz y Ec como prueba confirmativa [9].

En el medio regional y nacional, las investigaciones que permitan tener un estado actualizado de las dinámicas

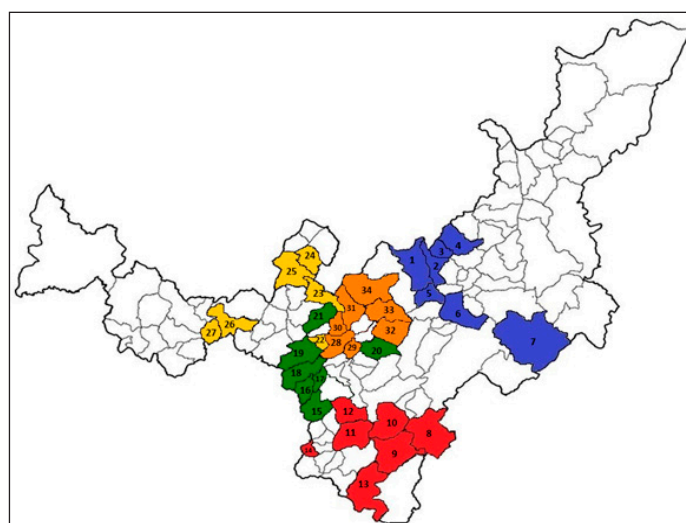
epidemiológicas de la enfermedad en los distintos Municipios, son escasos, por tanto, la posibilidad de validar los datos nacionales y así implementar discriminadamente programas de prevención, control y erradicación de la enfermedad se dificultan.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue determinar la seroprevalencia de brucelosis bovina en el Altiplano Boyacense, mediante la detección de anticuerpos contra *B. abortus*, así se actualizará la información de la región, necesaria para la implementación de programas de monitoreo, control y erradicación de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación geográfica

El estudio fue de tipo descriptivo y se realizó en el Altiplano Boyacense-Colombia, comparando las siguientes zonas: **Zona Norte (azul)** comprendida por los municipios de: 1) Duitama, 2) Santa Rosa de Viterbo, 3) Cerinza, 4) Belén, 5) Tibasosa, 6) Sogamoso, 7) Labranzagrande. **Zona oriental (roja)** que comprende los municipios de: 8) Páez, 9) Campo Hermoso, 10) Miraflores, 11) Garagoa, 12) Chinavita, 13) Santa María, 14) Guateque. **Zona sur (verde)**, con los municipios de 15) Úmbita, 16) Turmequé, 17) Nuevo Colón, 18) Ventaquemada, 19) Samacá, 20) Siachoque, 21) Chíquiza. **Zona Occidental (amarillo)**, que comprende a los municipios de: 22) Cucaita, 23) Arcabuco, 24) Togüí, 25) Moniquirá, 26) Chiquinquirá, 27) Caldas. Y, por último, **Zona Centro (naranja)** con los municipios de: 28) Tunja, 29) Soracá, 30) Motavita, 31) Cómbita, 32) Toca, 33) Tuta, 34) Sotaquirá. (FIG. 1)



**FIGURA 1. MAPA DE BOYACÁ CON LA DISTRIBUCIÓN DE LOS MUNICIPIOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO, DIVIDIDOS POR LA ZONAS EVALUADAS**

### Características de cada zona

**Zona Norte:** Comprende desde los 1.210 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.) (Labranzagrande) y los 2.760 msnm

(Cerinza); con un rango de temperatura de 16° hasta los 30°; con pluviosidades de hasta 3.334 milímetros (mm) al año en toda la zona [10].

La base forrajera varía únicamente para el municipio de Labranzagrande en donde se encuentra predominantemente *Brachiaria brizanta*; por su parte para los demás Municipios es pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinum*), Ray grass (*Lolium perenne*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*), estos últimos recursos forrajeros son los que más predominan en las demás zonas evaluadas.

**Zona Oriental:** está ubicada entre los 850 m.s.n.m. (Santa María) y los 1.800 m.s.n.m (Chinavita); cuyo rango de temperatura es de 14° hasta los 31°, así mismo, la pluviosidad promedio para la zona es de 2.500 mm anuales [10]. La base forrajera comprende *B. brizanta* y *decumbens* para todos los Municipios;

**Zona Sur:** Comprende desde los 2.480 m.s.n.m. (Úmbita) hasta los 2.900 m.s.n.m (Chíquiza), con una temperatura promedio para toda la zona de 15°C; con una pluviosidad promedio de 2.000 mm al año en toda la zona [10]; la base forrajera es Kikuyo, Ray grass, y trébol rojo.

**Zona Occidental:** Va desde los 1.650 m.s.n.m (Togúí) hasta los 2.650m.s.n.m. (Cucaita); la pluviosidad promedio es de 2.400 milímetros (mm) anuales y la temperatura promedio es de 18°C para toda la zona [10]. La base forrajera es Kikuyo, Ray grass, y trébol rojo, y en algunos municipios como Monquirá y Togúí, *B. decumbens*.

**Zona Centro:** comprende desde los 2.600 m.s.n.m (Tuta) hasta los 2.965 m.s.n.m (Motavita), la temperatura promedio de la zona es de 12°C y la pluviosidad promedio es de 2.200 mm anuales [10]. La base forrajera es Kikuyu, Ray grass y Trébol rojo.

#### Época de muestreo

La recolección y procesamiento de las muestras se dio en el período que comprende desde octubre 2017 hasta septiembre 2018.

#### Diseño de investigación

La investigación fue realizada tomando como estratos los grupos etarios de los animales, la población total bovina del Altiplano Boyacense, se tomó según datos del ICA [8], extraídos del último ciclo vacunal contra la fiebre aftosa. El cálculo de la muestra se determinó empleando el método de Putt y col. [22], el cual está indicado para estudios epidemiológicos en donde la hipótesis plantea la presencia de una enfermedad, pero esta debe ser cuantificada. Para la investigación se tomaron muestras de 24.098 bovinos de 1.289 predios, se discriminaron como hembras de 18-35 mes, hembras entre 36-59 mes, hembras mayores de 60 mes y machos.

La obtención de la muestra por Municipio se determinó,

aplicando un factor de ponderación ( $Wh$ ), el cual se obtuvo dividiendo la población de cada Municipio ( $N_x$ ) entre la población total ( $N$ ) ( $Wh_x = N_x/N$ ), este factor de ponderación ( $Wh_x$ ), se multiplica por el tamaño de la muestra total ( $n$ ). ( $Wh_x * n$ ).

#### Muestra poblacional

La población de referencia estuvo conformada por 24.098 animales mayores de 18 mes de edad. El tamaño de la muestra se estimó considerándose desconocida la prevalencia poblacional [11], y para garantizar que la misma fuera representativa de la población de referencia, se utilizó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{Z^2 \alpha / 2}{4(e)^2}$$

Donde N: Tamaño de la muestra; Z: 1,96 (Valor para el 95% de confianza); e: error máximo permisible=0,05;  $\alpha$ : nivel de significancia=0,05.

La edad de los animales incluidos en el estudio estuvo entre los siguientes grupos etarios: animales entre 18 a 35 mes ( $n=10.800$ ), entre 36 a 59 mes ( $n=9.100$ ), mayores de 60 mes ( $n=3.218$ ) y machos ( $n=980$ ). Las razas cruzadas predominantes en la población de bovinos estudiados fueron: Holstein ( $n=19.023$ ), Normando ( $n=4.150$ ), Cruces ( $n=750$ ), Pardo suizo ( $n=83$ ), Simmental ( $n=70$ ) y Airshire ( $n=22$ ).

#### Muestreo

Se utilizó muestreo estratificado proporcional en función al total de hembras bovinas existentes en cada sector y la selección de los animales se hizo en forma sistemática en aquellos predios con más de 5 animales de iguales características a la población en referencia [14].

#### Toma de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena coccígea, utilizando tubos al vacío sin anticoagulante, se separó el suero y se congeló a -40°C hasta el momento de la realización de las diferentes pruebas en un congelador marca Whirlpool®, referencia UW8 F2Y XBI F, fabricada por Whirlpool® en EUA. Para la realización de la prueba de RB, se depositaron 30 microlitros ( $\mu L$ ) de suero y 15  $\mu L$  de antígeno (Técnica modificada) sobre una placa de aglutinación, se mezcló y homogenizó suavemente por 4 minutos (min), después de los cuales se visualizó la presencia de aglutinación macroscópicamente [17]. Los sueros positivos por el método de RB modificado fueron sometidos a la prueba RB convencional (30  $\mu L$  del suero más 30  $\mu L$  de antígeno). Los sueros positivos por el método RB Modificado fueron remitidos al centro de diagnóstico animal del ICA (Sogamoso), donde se realizó FP y Ei como pruebas tamiz y para confirmar se enviaron al centro de diagnóstico animal del ICA (Bogotá) para Ec.

#### Definición e interpretación de los resultados de seropositividad



Para definir las regiones de alta, moderada y baja incidencia de brucelosis bovina, se tuvieron en cuenta los criterios establecidos por el comité mixto de expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) en brucelosis para América Latina [18].

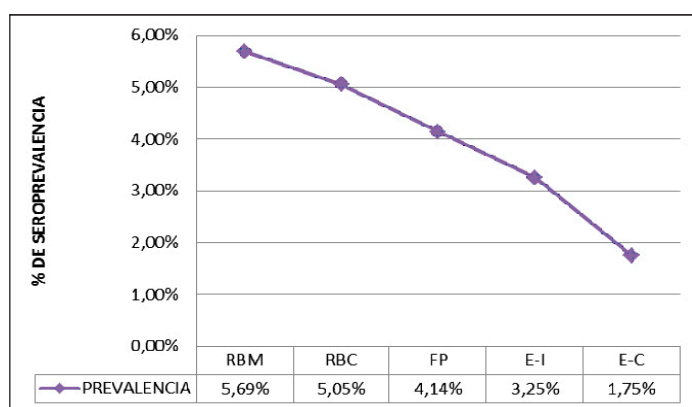
**Para rebaños:** Niveles de infección baja en rebaños con índices de infección menores del 10%. Moderados rebaños entre el 10 a un 35% de infección; altos, cuando la seropositividad es superior al 35%.

**Para animales:** Niveles de infección bajos, una positividad en animales menor del 3%, niveles de infección moderados, entre un 3 a un 10% de animales infectados y niveles de infección altos, cuando los índices de infección son superiores a un 10%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

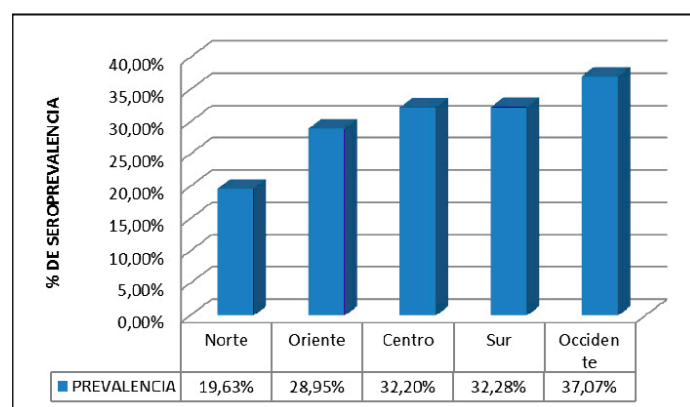
El criterio para modificar la prueba se basó en el concepto de que, a menor concentración de antígeno, hay mayor probabilidad de formación de complejos inmunes multivalentes y por lo tanto, mayor es la probabilidad de evidenciar macroscópicamente la aglutinación. Por lo mismo, solo se detectaron 1.219 bovinos positivos a la prueba convencional de RB, mientras que al realizar la prueba modificada se encontraron 1.372, positivos, de los cuales 424 fueron confirmados por la prueba Ec, lo que muestra que la prueba de tamizaje convencional puede confundir animales positivos por infección, animales vacunados y animales con residuos de títulos.

Los resultados obtenidos sobre brucelosis bovina en el Altiplano Boyacense utilizando la prueba de Rosa de Bengala modificada (RBM) mostraron para esta área una prevalencia de (5,69%); al utilizar la prueba RB convencional la prevalencia es de (5,05%). Al utilizar la prueba de FP la prevalencia fue de (4,14%). Al utilizar la prueba de Ei la prevalencia fue de (3,25%) y al confirmar los sueros por Ec la prevalencia fue de (1,75%), esto indica que en el Altiplano Boyacense el perfil epidemiológico de la enfermedad es bajo, debido a que existe vacunación (Cepa-19), (FIG. 2).



**FIGURA 2. PORCENTAJE DE BOVINOS SEROPOSITIVOS EN CADA PRUEBA SEROLÓGICA**

La zona de mayor prevalencia es la zona de Occidente: 37,07%, seguida de la zona Sur: 32,28%, zona Centro: 32,20%, zona Oriente: 28,95% y zona Norte: 19,63% (FIG. 3). La prevalencia de la zona Occidente es la suma de individuos infectados (Ec: 96) sobre total seleccionados (RB Modificado: 259) por cien por ciento: 37,07%; la prevalencia de la zona Sur es la suma de individuos infectados (Ec: 82) sobre total seleccionados (RB Modificado: 254) por cien por ciento: 32,28%; la prevalencia de la zona Centro es la suma de individuos infectados (Ec: 171) sobre total seleccionados (RB Modificado: 531) por cien por ciento: 32,20%; la prevalencia de la zona Oriente es la suma de individuos infectados (Ec: 33) sobre total seleccionados (RB Modificado: 114) por cien por ciento: 1,14%; la prevalencia de la zona Norte es la suma de individuos infectados (Ec: 42) sobre total seleccionados (RB Modificado: 214) por cien por ciento: 19,63%. (FIG. 3)



**FIGURA 3. PORCENTAJE DE SEROPREVALENCIA PARA BRUCELOSIS BOVINA POR CADA ZONA ESTUDIADA A TRAVÉS DE ELISA-COMPETITIVA**

Al separar las hembras por rangos de edad 24 a 35 mes, 36 a 59 mes y mayores de 60 mes se encontró que a medida que aumenta la edad, en términos generales, la prevalencia se hace mayor (TABLA I).

Los resultados obtenidos sobre brucelosis bovina en el Altiplano Boyacense utilizando la prueba RB modificada mostraron para esta área una prevalencia de 5,69%; esto indica que en el Altiplano Boyacense el perfil epidemiológico de la enfermedad es alto, a sabiendas que existe vacunación, al comparar este resultado con un estudio de Aricapa y col. [1], en la zona de Caldas, Colombia, donde obtuvieron un 1,97%. Al utilizar la prueba RB convencional, la prevalencia es de 5,05% mientras que para Aricapa y col. [1] fue de 0,32%. Al utilizar la prueba de FP, la prevalencia fue de 4,14% al utilizar la prueba de Ei, la prevalencia fue de 3,25% y al confirmar los sueros por Ec la prevalencia fue de 1,75%.

Al estudiar cada zona, se encontró que en la zona norte la prevalencia por Ec fue de 0,17 %, y el Municipio que muestra mayor prevalencia es Duitama con el 0,06 %.

En la zona centro la prevalencia fue del 0,70 % y el Municipio

**TABLA I**  
**SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS DETERMINADA A TRAVÉS DE ELISA**  
**COMPETITIVO, SEGÚN EDAD EN CADA ZONA EVALUADA**

	Hembras entre 18 a 35 meses	Hembras entre 36 a 59 meses	Hembras mayores de 60 meses	Machos
	%	%	%	%
Norte	0,46	0,63	1,23	2,45
Sur	0,76	1,97	3,38	3,80
Centro	1,35	2,07	3,12	6,61
Oriente	0,65	1,00	1,09	5,26
Occidente	1,69	3,91	4,84	8,33

con mayor prevalencia fue Sotaquirá con el 0,43%. En la zona sur la prevalencia fue del 0,34 % y el Municipio con mayor prevalencia fue Ventaquemada con el 0,29%. En la zona Oriente la prevalencia fue del 0,14% y el Municipio con mayor prevalencia fue Guateque con el 0,07%. En la zona Occidente la prevalencia fue del 0,40 % y el Municipio con mayor prevalencia fue Chiquinquirá con el 0,21 %.

Ferlmer y col. [7] en estudios realizados en Chile aplicaron en predios lecheros el sistema de análisis por ELISA de tanques prediales, lo que permitió la vigilancia y el monitoreo predial a un bajo costo, de enfermedades, como la brucelosis, la leucosis, la diarrea viral y la rinotraqueítis infecciosa bovina, contando con un diagnóstico precoz y de alerta temprana ante la introducción de algunos patógenos en los predios. La prevalencia predial a brucelosis no superó el 5%, situación que se explica por el programa de control y de erradicación, implementado en ese país. Estas cifras son inferiores a las de un estudio de Tique y col. [24], que alcanzaron el 12,7% y que incluyó 4.922 predios ganaderos en el departamento de Córdoba-Colombia, mientras que para el presente estudio la prevalencia predial fue del 3%.

Quijada y col. [23], en Venezuela, estimaron una seroprevalencia de 0,84% en 592 bovinos de doble propósito, por la técnica de RB, al igual que en Perú [13], en la provincia de Puerto Inca la prevalencia fue de 0,031% en 3.221 animales; cifras inferiores a las del presente estudio y que demuestran los resultados favorables obtenidos por la implementación de los programas de erradicación en esos países. Mientras que para México, Peña y col. [20] encontraron una prevalencia del 6,8 en zonas de alta producción láctea en Jalisco, por la técnica de RB, prevalencia alta si se compara con la obtenida por el presente estudio (1,75% por RB).

D'Pool y col. [5], en Venezuela con 387 hembras bovinas mayores de 24 mes de edad determinaron por la técnica de Ec una prevalencia de brucelosis del 20,3% en rebaños y 9,1%, por animal. Demostró la alta especificidad de la Ec sobre la Ei, por lo cual, la utilización de la técnica en áreas endémicas, donde es muy probable la exposición a *Brucella* sin desarrollo de la enfermedad, sería ampliamente recomendada, teniendo en cuenta que permite distinguir anticuerpos inducidos por vacuna, de los

anticuerpos inducidos por una infección natural.

El ICA [9] en el programa nacional de control y de erradicación de la brucelosis bovina ha establecido la vacunación obligatoria de las terneras entre 3 y 8 mes de edad, con las vacunas cepa 19 o cepa RB51, en dos ciclos de vacunación anual. La cobertura nacional para 2.017 alcanzó cifras del 83,8% y, en el departamento de Boyacá, para el ciclo II de vacunación, la cobertura de vacunación fue del 88,0%; se realizó la vacunación de animales en 10.027 predios, con cepa 19 (9.729), 97,02% y con RB 51 (298) 2,98%. Esta información permite establecer que, la vacunación es un mecanismo de saneamiento que es utilizado en esta zona, considerada como de prevalencia baja de la enfermedad [6, 16]

## CONCLUSIONES

La prevalencia de brucelosis bovina determinada a través de Ec en el Altiplano Boyacense fue de 1,75 %. Se confirma la mayor sensibilidad y especificidad de la prueba Ec comparada con las otras pruebas RB Modificada, RB Convencional, FP y Ei, pudiéndose detectar y diferenciar hembras vacunadas de infectadas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARICAPA, H.; JARAMILLO, A.; PÉREZ, J.; LONDOÑO, L.; CASTILLÓN, A. Prevalencia de brucelosis bovina, equina y humana en Caldas-Colombia-Suramérica. **Biosalud**. 7: 75-87. 2008.
- [2] DORNELES, E. M.; CARVALHO, A.T.; ARAÚJO, M.S.; SRIRANGANATHAN, N.; LAGE, A.P. Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. **Vaccine**. 33: 3659-3666. 2015.
- [3] DUCROTOY, M.J.; CONDE, R.; BLASCO, J.M.; MORIYÓN, I. A review of the basis of the immunological diagnosis of ruminant brucellosis. **Vet. Immunol**. 171: 81-102. 2016.
- [4] DUCROTOY, M.J.; MUÑOZ, P.M.; CONDE, R.; BLASCO,

- J.M.; MORIYÓN, I. A systematic review of current immunological tests for the diagnosis of cattle brucellosis. **Prev. Vet. Med.** 151: 57-72. 2018.
- [5] D'POOL, G.; RIVERA, PS; TORRES, T; PÉREZ, M. Prevalencia de Brucelosis bovina mediante Elisa Competitivo en el municipio La cañada de Urdaneta. Estado Zulia, Venezuela. **Rev. Científ. FVC-LUZ.** XIV (2): 168-176. 2011
- [6] FEDERACIÓN COLOMBIANA DE GANADEROS (FEDEGAN). Informe final ciclo II 2016. Coordinación regional Boyacá. Ed. FEDEGAN. Tunja, Boyacá, Colombia. Pp 22. 2016.
- [7] FELMER, R.; ZÚÑIGA, J.; LÓPEZ, A.; MIRANDA, H. Prevalencia y distribución espacial de brucelosis, leucosis bovina, diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina a partir del análisis ELISA de estanques prediales en lecherías de la IX Región, Chile. **Arch. Med. Vet.** 41:17-26. 2009
- [8] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Censo Nacional Agropecuario 2016. Bogotá, Colombia. En línea: <https://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2016.aspx>. 13-04-2018
- [9] INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA). Resolución 7231 "Por medio de la cual se establecen las medidas sanitarias para la prevención, control y erradicación de Brucelosis en las especies bovina, bufalina, ovina, caprina, porcina y equina en Colombia". Bogotá, Colombia. 2017. En línea: <https://www.ica.gov.co/getattachment/7a6ab972-d22d-4c70-9421-bb2a7199df88/2017R7231.aspx>. 17-04-2018
- [10] INSTITUTO DE HIDROLOGÍA, METEOROLOGÍA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Consulta y descarga de datos hidrometeorológicos 2018. En línea: <http://www.ideam.gov.co/>. 05-05-2018
- [11] MÁLAGA, H. Cualificación y Cuantificación de la Enfermedad-Estudios Epidemiológicos de Factores de Riesgo. **Epidem. Vet.** 47: 191-193. 2010.
- [12] MARIÑO, O.C. Brucelosis metodologías diagnosticas e interpretación de resultados. **Rev. MVZ Córdoba.** 5: 57-60. 2005.
- [13] MEZA, C.; MORALES, S.; ARA, M.; MANCHEGO, A.; CALLE, S.; ANGULO, C. Seroprevalencia de brucelosis bovina en el distrito de Puerto Inca, Huánuco. **Rev. Investig. Vet. Perú.** 21: 223-226. 2010.
- [14] MORRIS, T. Multiple Experiments. **Experimental Design and Analysis in Animal Sciences.** CABI Publishing (Ed.). New York. USA. Pp. 156-165. 2015
- [15] NDEGU, M.; MATOPE, G.; WICHATITSKY, M.; TIVAPASI, M.; SCACCHIA, M.; BONFINI, B.; MUBIKA, D. Seroprevalence of brucellosis in cattle and selected wildlife species at selected livestock/wildlife interface areas of the Gonarezhou National Park, Zimbabwe. **Prev. Vet. Med.** 146: 158-165. 2017.
- [16] ORJUELA, R.; ANDREWS, E.; GONZÁLEZ, A.; DONOSO, G.; OÑATE, A. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategia de prevención basadas en ácido nucleicos. **Arch. Med. Vet.** 38:7 – 18. 2016.
- [17] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Manual de Procedimientos. **Técnicas de diagnóstico de Brucelosis.** OMS. Pp 16-19. 2016.
- [18] CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA (PANAF-TOSA/OPS/OMS). Análisis de Situación de los Programas Nacionales de Prevención de Brucelosis y Tuberculosis por *M. bovis*. Reunión Inter-Agencial. Informe final. Ciudad de México, DF. Pp.7-10. 2017
- [19] PATHAK, A.D.; DUBAL, Z.B.; KARUNAKARAN, M.; DOJAD, S.P.; RAORANE, A.V.; DHURI, R.B.; BALE, M.A.; CHAKURKAR, E.B.; KALOREY, D.R.; KURKURE, N.V.; BARBUDDHE, S.B. Apparent seroprevalence, isolation and identification of risk factors for brucellosis among dairy cattle in Goa, India. **Comp. Inn. Micr. Infec. Dis.** 47: 1-6. 2016.
- [20] PEÑA, A.; CERVINI, J.; PADILLA, L.; DELGADILLO, J. Prevalencia de Brucelosis bovina en la región de producción lechera de Jalisco, México. **Rev. Iber. Cien.** 1: 245-252. 2004.
- [21] PRAUD, A.; DURÁN, M.; FRETIN, D.; JAY, M.; O'CONNOR, M.; STOURNARA, A.; TITTARELLI, M.; TRAVASSOS, I.; GARIN, B. Evaluation of three competitive ELISAs and a fluorescence polarization assay for the diagnosis of bovine brucellosis. **Vet. J.** 216: 38-44. 2016.
- [22] PUTT, S.; SHAW, A.; WOODS, A.; TYLER, L. Sampling techniques in epidemiological studies. **Veterinary Epidemiology and Economics in África.** Pp. 9-11. 2011.
- [23] QUIJADA, T.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, G.; GARCÍA, G.; MARCHÁN, V.; CARUCÍL P. Prevalencia serológica de Brucelosis en bovinos de la parroquia Moroturo, municipio Urdaneta, estado Lara. **Gac. Cien. Vet.** 10: 1-4. 2004.
- [24] TIQUE, V.; GONZÁLEZ, M.; MATTAR, S. Seroprevalencia de *Brucella abortus* en Bovinos del Departamento de Córdoba. **Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.** 12: 51-59. 2009.

# PREVALENCE OF THE MAJOR DISEASES IN *Penaeus vannamei* FARMED OF SINALOA MEXICO

## Prevalencia De Las Principales Enfermedades En *Penaeus Vannamei* De Cultivo En Sinaloa, Mexico

María Soledad Morales-Covarrubias<sup>1\*</sup>, Noemí García-Aguilar<sup>1</sup>, María del Carmen Bolan-Mejía<sup>1</sup> and Oscar Guillermo Zamora-García<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Center in Food and Development A.C., Mazatlán Unit in Aquaculture and Environmental Management in Mazatlán, Av. Sábalo Cerritos S/N, Mazatlán, 82100, Sinaloa, México. \*Corresponding author. Email: marisol@ciad.mx. Orcid.org/0000-0001-6230-3718 Tel: +526699898700 Ext. 275; Fax: +526699898701 <sup>2</sup>Postgraduate program in Marine Sciences and Limnology, Mazatlán Academic Unit, National Autonomous University of Mexico, Mazatlán, Sinaloa, México.

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence and severity of the diseases: acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND), necrotizing hepatopancreatitis (NHPB) caused by intracellular bacterium (*Hepatobacter penaei*), septic hepatopancreatic necrosis (NHPS), and the white spot syndrome virus (WSSV) in farmed shrimp during two productive cycles (spring and summer) in the years (yrs) 2016 and 2017. From 360 studied shrimps, 90% showed external characteristics of apparently healthy animals, while only 10% of the specimens presented red coloration, soft cuticle, and muscular opacity. AHPND was the disease with the higher average prevalence for all the studied zones and seasons, with a prevalence of 53.33% in 2016 and 60.16% in 2017, followed by NHPS with 36.66% in 2016 and 42.83% in 2017. The incidence of WSSV was the lowest compared to the other diseases studied in this work, with 16.16% in 2016 and 20% in 2017; NHPB was only observed in summer with an average prevalence of 16.16% for both yrs. The northern area of Mexico registered the highest rates of mortality associated to these diseases, excluding WSSV, which resulted in being the most prevalent disease in the southern area (although such difference it is not statistically significant). The specimens diagnosed with AHPND exhibit severe damage in hepatopancreas as well as cellular detachment in the intestinal proximity. The organisms with NHPS showed multifocal cellular detachment in hepatopancreas and bacteria growth in heart, gills, lymphoid organ, connective tissue and muscles. The physicochemical variables considered for this study did not show significant variability among the zones and seasons analyzed, however, any alteration on these parameters might cause stress in the shrimps impairing the immune response against opportunistic pathogens. The presence of bacterial and viral diseases identified in this work is likely related to a low quality of the post-larvae, or an inadequate farming environment.

**Key words:** Diseases; AHPND; WSSV; NHPS; NHPB; shrimp

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia y severidad de las enfermedades Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND), Necrosis del Hepatopáncreas (NHPB) causado por bacterias intracelulares (*Hepatobacter penaei*), bacteriosis (NHPS) y el virus de la mancha blanca (WSSV), en camarones de cultivo durante dos ciclos (primavera y verano) en los años 2016 y 2017. Los resultados de los 360 camarones colectados mostraron características externas de animales aparentemente sanos (90%) y 10% con coloración rojiza, cutícula suave y opacidad muscular. AHPND fue la enfermedad con mayor prevalencia promedio para todas las zonas y temporadas con 53,3% en 2016 y 60,6% en 2017, seguida de NHPS con 36,66% en 2016 y 42,3% en 2017. La prevalencia de WSSV fue baja respecto a las demás con 16,16% en 2016 y 20% en 2017. NHPB se presentó en verano con prevalencias de 16,6 para 2016 y 2017. La zona norte presentó la mayor prevalencia de las enfermedades excluyendo a WSSV, misma que obtuvo una prevalencia mayor en la zona sur que en las demás zonas (sin embargo, dicha diferencia no es estadísticamente significativa). Los organismos con AHPND presentaron daños severos en hepatopáncreas con desprendimiento celular de la región proximal al intestino y NHPS con desprendimiento celular multifocal en hepatopáncreas y presencia de colonias de bacterias en corazón, branquias, órgano linfoide, tejido conectivo, musculo y ciegos hepáticos. Los parámetros fisicoquímicos en este trabajo no tuvieron diferencias significativas entre zonas en cada temporada, sin embargo, la alteración de alguno de ellos ocasiona estrés en los camarones, reduciendo la actividad anti-patógenos oportunistas. La presencia de las enfermedades bacterianas y virales identificadas en este trabajo probablemente estuvieron relacionadas con la calidad de la postlarva, o por un inadecuado ambiente de cultivo, propiciado por acumulación de materia orgánica

**Palabras clave:** Enfermedades; AHPND; WSSV; NHPS; NHPB; camarones

## INTRODUCTION

Shrimp farming industry in Mexico generates significant revenues and employment on the States where it is carried out and has now become a vital development axis in rural areas [7]. Nevertheless, diseases such as white spot syndrome virus (WSSV), septic hepatopancreatic necrosis (NHPS), hepatopancreatic necrosis (NHPB) caused by intracellular bacterium (*Hepatobacter penaei*), and acute hepatopancreatic necrosis (AHPND) have become the most common pathologies affecting the health of farmed shrimp and causing high mortalities in many shrimp farms.

Semi-intensive and intensive shrimp farms in Nayarit, México, suffered from massive mortalities of shrimps within the first 20 days (d) of farming in early April 2013. Almost simultaneously, the same problem was observed all around the Northwest area of Mexico (Sinaloa, Sonora y Nayarit), which is the most productive area of farmed shrimp in Mexico (90% of the total production). At present, high early-mortality rates have occurred in Chiapas, Tamaulipas, Yucatán, Colima, and Baja California (Valle de Mexicali); the latter two farm shrimp on low salinity water systems [18].

The principal characteristic of these disease outbreaks was AHPND with no visible infectious agents in the necrotic tissue. The AHPND diagnosis was carried out in a presumptive way using several techniques: findings in the production ponds (clinical signs); wet mount (wet analysis), from which three growing stages were determined (initial, acute and final phases); confirmation through histopathologic study (initial, acute and final phases); and by polymerase chain reaction (PCR) on infected shrimps individually until defining each bacterial taxonomy [18, 23].

Within the last three years (y) there has been a steady increase in farming densities, while the correct management of the physicochemical variables has been decreasing [2]. This situation has promoted the spread of diseases with moderate to severe mortality that directly affects the rentability of the shrimp farming systems. Several strategies have been implemented to minimize the impact of high mortality caused by AHPND in Mexican shrimp farms: introduction of domesticated and genetically modified strains of white shrimp *Penaeus vannamei*; introduction of maternity techniques in shrimp farm; two-phase intensive production; closed systems; probiotic, prebiotic, and natural medicine; low farming density; and improvement of soil and water quality.

The aim of this study was to determine the prevalence and severity of the diseases: acute hepatopancreatic necrosis (AHPND), hepatopancreatic necrosis (NHPB) caused by intracellular bacterium (*Hepatobacter penaei*), septic hepatopancreatic necrosis (NHPS), and the white spot syndrome virus (WSSV) in farmed shrimp during two productive cycles (spring and summer) in 2016 and 2017 y.

## MATERIALS AND METHODS

### Area of study

The study was conducted in the State of Sinaloa, located in the northwest of Mexico (27° 02' - 22° 29' W; 105° 23' - 109° 28' N), using three regions: North, Guasave; Center, Navolato; and South, Mazatlán (FIG. 1).



**FIGURE 1. GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF STUDY LOCATIONS:**

### **NORTH (N), CENTER (C), AND SOUTH (S), IN SINALOA, MEXICO**

During the y 2016 and 2017, the study was carried out in six shrimp farms operating under a semi-intensive farming scheme with a density of 15 organisms/meters (m). A sampling location was selected if at least one farm in each region had previously reported cases of AHPND with an incident rate between 10 and 20%, severity grade of 1 and 2, and mortality rate of at least 15%. The sampling locations were selected using the diseases reports from 2014 and 2015 [16-18].

### Sample collection

Sample collection was conducted two times per y (during May and September) in each of the selected farms (6 per y; 30 shrimps were randomly selected, totaling 360 samples in two y). The average weights of the organisms were between  $2.12 \pm 1$  gram (g), for the first sampling and  $15.38 \pm 3$ g for the second, in both y.

Capture of sample organisms were performed in four different spots, independent from the inlet and outlet gates of pond, using throw nets of 2 m in diameter. The collected shrimps were transported to the laboratory in plastic containers with aeration and filled with water from the sampled pond. The samples were physically inspected to detect any possible external alterations such as body coloring; melanization; deformation and necrosis of cuticle, gills, and appendixes; since these symptoms commonly

indicate the presence of pathologies.

### Preservation and sampling processing for histology

Organisms were injected with Davidson solution (Alcohol-Formaldehyde-Acetic Acid; AFA as recommended by Bell & Lightner [1], deposited in glass jars (250 and 500 milliliters (mL)) and kept them immersed for 48 hours (h). Subsequently, the samples were washed with regular water and preserved in 70% ethanol to be histologically analyzed using the Bell & Lightner [1] and Lightner [12]. General histopathological diagnosis to detect alteration in different organs and tissues of the sample organisms were performed using the protocols described by Bell & Lightner [1], Lightner [12], Tran *et al.* [25], and Morales-Covarrubias *et al.* [18]. A microscope with transmitted light (Olympus BX 60-Japan), using 4x, 10x, 40x, X60 and 100x objectives and a digital camera (Infinity 5.0 – Olympus Japan) mounted on the microscope were used for visual examination and image recording.

### Bacteriology analysis

Organisms were disinfected with 70% ethanol; the exoskeleton was then removed while stomach and hepatopancreas were dissected. Samples were weighed (BOECO-FA-2204-Germany) and homogenized in a 2.5% NaCl sterile solution (1000 microliters ( $\mu$ L)). Subsequently, 100  $\mu$ L homogenized samples were taken and deposited in 900  $\mu$ L 2.5% NaCl solution. From the latter solution a 100  $\mu$ L sample was deposited in thiosulfate agar – citrate – bile salts – sucrose (TCBS-Merck) and Marine Agar (AM-DIFCO), incubated for 24 h at 30 °C for total and green colony counting. The green colonies obtained from the TCBS plates were then transferred to CHROMagar™ Vibrio (chromogen medium for detection and isolation of *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, and *V. cholerae*) and incubated (VWR-Scientific-1516 USA) for 24 h at 30°C.

### WSSV analysis

Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) [12] was performed on gills and muscle fixed with 70% ethanol. The test was carried out using an IQ 2000™ commercial kit for WSSV analysis (PCR TECH) for detecting DNA fragments of the WSSV's genome. The test uses a semi-quantitative direct PCR which diagnoses four infection levels: no infection, slight infection (20 DNA copies), moderate infection (200 DNA copies), and severe infection (2000 DNA copies). To validate the results, the test includes an internal control that identifies shrimp actin and a positive standard that is quantifiable according to the severity of the infection.

### Statistical analysis

#### Disease prevalence

The prevalence determination of the four diseases were performed through estimation of the percentage of infected organisms in each of the sampling zones (three regions: North, Guasave; Center, Navolato; and South, Mazatlán), y (2016 and 2017) and season (spring and summer).

The statistic difference between zones and seasons of the y were evaluated through the  $\chi^2$  test. Moreover, the independence regarding the prevalence of both variables were evaluated using 3D-contingency tables (Microsoft Excel®).  $\chi^2$  homogeneity test was performed to evaluate the statistical differences between the prevalence of disease per zone. When no statistical difference was found, the average prevalence was used, for each disease under this condition, to have a comparing figure between seasons and other y.

#### Effect of water physicochemical variables on the prevalence of different diseases

A collinearity evaluation of the water physicochemical variables was carried out prior the assessment of the possible effects of these variables on the prevalence of the disease. The evaluation

TABLE I  
PREVALENCE (%) OF ACUTE HEPATOPANCREATIC NECROSIS (AHPND), HEPATOPANCREATITIS NECROSIS CAUSED BY INTRACELLULAR BACTERIA (NHPB), SEPTIC HEPATOPANCREATIC NECROSIS (NHPS), AND THE WHITE SPOT SYNDROME VIRUS (WSSV) ON THE 3 ZONES AND SAMPLING SEASON DURING 2016 AND 2017

		Spring	Summer	Spring	Summer	Spring	Summer
2016	AHPND	60	43	97	30	43	47
	NHPS	23	70	20	43	27	37
	WSSV	13	20	7	20	10	27
	NHPB	0	50	0	30	0	17
2017	AHPND	50	97	67	47	50	50
	NHPS	40	50	50	27	50	40
	WSSV	10	13	27	23	27	20
	NHPB	0	50	0	27	0	20

assumed that the variables change depending on the season on which are measured. Pearson correlation tests were conducted [26].

### Interaction between diseases

The interaction between diseases were evaluated using contingency tables (1x2) for all the possible combination of diseases, obtaining the coincidence percentage of presence for more than one disease in the same organism.

## RESULTS AND DISCUSSION

From 360 analysed organisms, 90% showed external signs of apparently healthy animals, while 10% presented red colour, soft cuticle, and muscular opacity. The prevalence of the four major diseases was obtained for every zone, y and sampling season (spring and summer) as shown in TABLE I. The alterations description of the organs and tissues through histology was made in a decreasing order related to the medium value of the prevalence of each disease.

### Bacteriology and histopathology analysis

Acute hepatopancreatic necrosis (AHPND), was observed on all three sampling zones con 53.33% of prevalence in 2016 and 60.16% in 2017. The infected organisms (degree 1 and 2) exhibited vermiform structures in the hepatopancreas lumen tubules (FIG. 2-A); cellular detachment of the hepatopancreatic tubules, from proximal to distal areas, revealing the tubular conduits (FIG. 2-B); and elongation of epithelial cells (FIG. 2-C) cells with picnotic nuclei. Bacteriologic assessment of the organisms with AHPND, whose infection was confirmed through PCR and histology, revealed  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFU) in the stomach, and  $1 \times 10^4$  CFU in hepatopancreas.

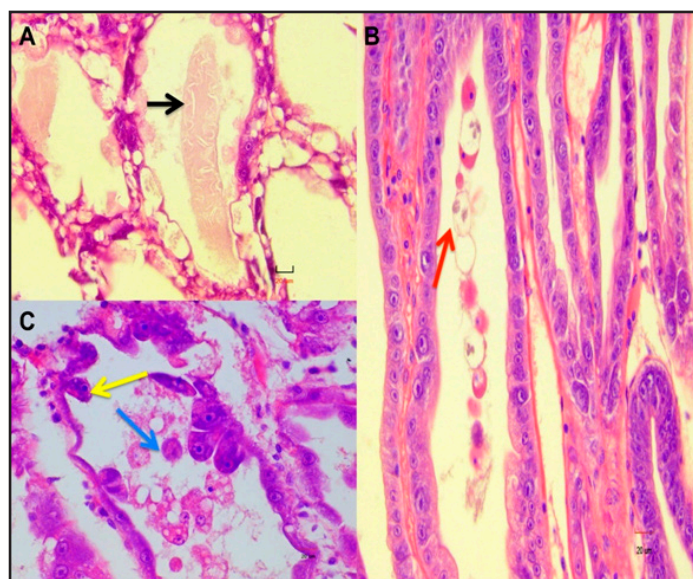


FIGURE 2. *Penaeus vannamei* HISTOLOGICAL sections of Hepatopancreas with ahpnd the vermiform structures

((a-black arrow) in the hepatopancreas lumen tubules. cellular detachment of the hepatopancreatic tubules ((b- blue and c-red arrows) from proximal to distal areas, revealing the tubular conduits and elongation of epithelial cells (c-yellow arrow). staining method: hematoxylin-eosin. scale bar = 20  $\mu$ m

Septic hepatopancreatic necrosis (NHPS) was detected in the three sampling zones and with an average prevalence of 36.66% in 2016 and 42.85 in 2017. The detected organisms were associated with one or two species of bacteria (*Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio harveyi*) in the hemolymph and hepatopancreas ( $1 \times 10^5$  UFC). The samples exhibited infiltration in haemocytes (FIGS. 3A – blue arrow), clustered in the center of haemocytic nodule (FIGS. 3A and 3B – black and red arrows), and infiltrations in the haemolymph (FIG. 3A-blue arrow); causing lumen's hypertrophy, melanization, necrosis, moderate to severe atrophy of the hepatopancreatic tubules (FIG. 3A, white arrow), and cellular detachment. Moreover, the hemocytes infiltration and hemocytes nodule formation in the presence of bacterial colonies were also spotted in heart, gills, connective tissue (FIG. 3C, yellow arrow), lymphoid organ (FIG. 3D, black arrow), muscle, and blind liver tissue with severity degrees of 2 and 3.

The white spot syndrome virus (WSSV) showed relatively low prevalence, 16.16% in 2016 and 20% in 2017 (TABLE I) according to PCR analysis (FIG. 4). WSSV was observed forming inclusion bodies (Cowdry Type C) in eosinophilic hypertrophied cells of the stomach epithelium, cuticular epithelium (FIG. 5), and in gills, all with severity degree 1 and 2.

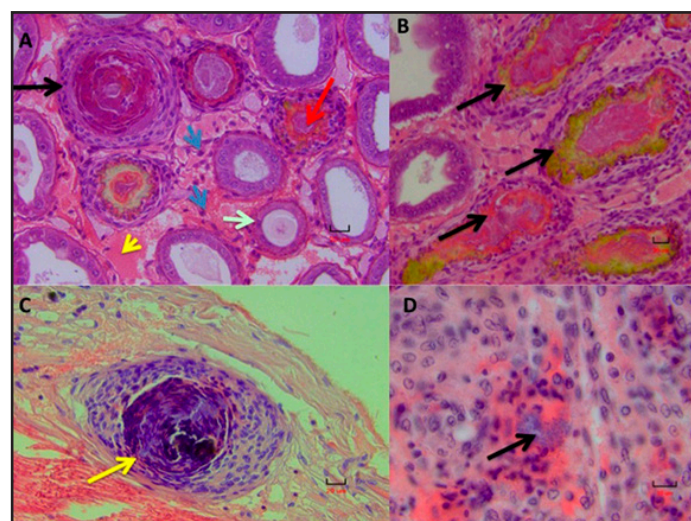


FIGURE 3. histological sections of hepatopancreas (a and b), connective tissue (b) and lymphoid organ (d) of *penaeus vannamei* with hepatopancreatic necrosis caused by bacteria (nhps), showing melanized haemocytes nodules with bacterial clusters in the center area (a, b and c; black, red and yellow arrows); haemocytes infiltration (a, blue arrow)

and haemolymph (a, yellow arrow); hepatopancreatic tubules atrophy (a, white arrow); clusters of bacteria (d, black arrow). staining method: hematoxylin-eosin. scale bar = 10  $\mu$ m (d) and 20  $\mu$ m (a,b and c)

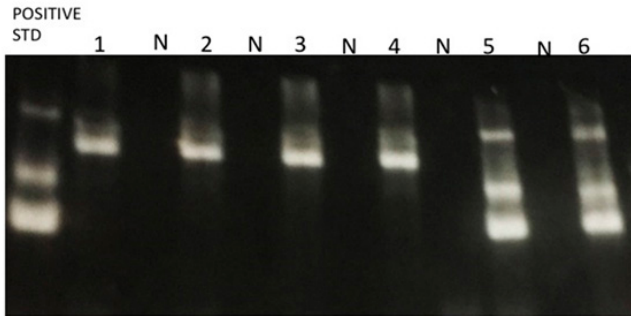


FIGURE 4. WSSV INFECTION LEVELS OBTAINED FROM NESTED PCR ANALYSIS (IQ 2000™). POSITIVE STANDARD (2000 COPIES), N: NEGATIVE. LINES: 1-3: NEGATIVE SAMPLES; 5-6: POSITIVE SAMPLES (2000 COPIES)

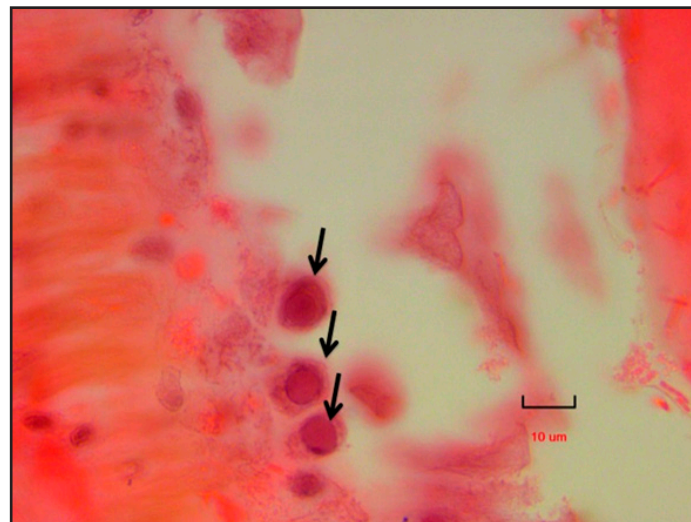


FIGURE 5. *Penaeus vannamei* HISTOLOGICAL SECTIONS OF CUTICULAR EPITHELIIUM WITH INCLUSION BODIES (ARROWS) IN HYPERTROPHIED EOSINOPHILIC (DEGREE 1) NUCLEI. STAINING METHOD: HEMATOXYLIN-EOSIN. SCALE BAR = 10  $\mu$ m

Hepatopancreatic necrosis (NHPB) resulted in an average prevalence of 16.16% in 2016 and 2017, only during summer. The analyzed organisms presented tubular deformation, lumen hypertrophy, hemocytic infiltration, melanization, necrosis, intracellular bacteria, cellular detachment, and hemocytic encapsulation surrounding the atrophied tubules of the hepatopancreas, all with severity degree 1 and 3 (FIG. 6).

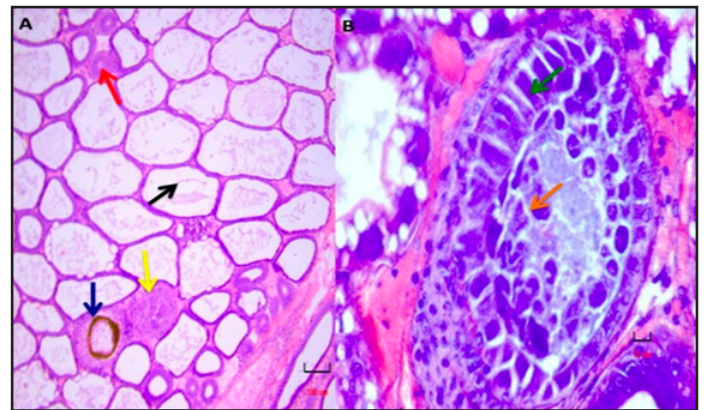


FIGURE 6. *Penaeus vannamei* histological sections of hepatopancreas with tubular atrophy (a: red arrow), lumen hypertrophy (a: black arrow); intercellular bacteria in the tubules cells cytoplasm (b: green arrow), intercellular bacteria in the tubular lumen (b: orange arrow); melanized hemocytic nodules (a: blue arrow), and hemocytic encapsulation surrounding the atrophied tubules of the hepatopancreas (a: yellow arrow) staining method: hematoxylin-eosin. scale bar = 10  $\mu$ m (b) and 10  $\mu$ m (a)

#### Statistical analysis

The mutual independence test between the zone and the sampling season for each disease per y is summarized in TABLE II.

The hypotheses contrasting this test was:

TABLE II  
Summary of the mutual independence test results that prove the relationship between the sampling zone and season for each disease per year

Disease	Year	Test result (p value: $\chi^2$ )	Interpretation
AHPND	2016	0.00003	Rejects $H_0$
	2017	0.0015	Rejects $H_0$
NHPS	2016	0.0024	Rejects $H_0$
	2017	0.6248	Accepts $H_0$
WSSV	2016	0.5253	Accepts $H_0$
	2016	0.7107	Accepts $H_0$

$H_0$ : There is independence between the sampling zone and season concerning the presence or absence of a determined disease during the sampled yrs.

$H_1$ : There is dependence between the sampling zone and season concerning the presence or absence of a determined disease during the sampled yrs.

However, in the case of NHP, the evaluation did not follow the rules above mentioned, because the prevalence of this disease



**TABLE III**  
**Summary of the measured physiochemical variables on the farming ponds for each sampled zone, season and y**

Year	Zone Variable	North		Center		South	
		Spring	Summer	Spring	Summer	Spring	Summer
2016	Temperature (°C)	27	31	29	30	29	30
	Salinity	36	39	38	38	35	39
	O2 (mg/l)	6	5	7	6	7	6
	PH	7.5	8	7	8.5	7	9
	Ammonia	1	1.5	1	2	1	2
2017	Temperature (°C)	27	30	29	30	29	30
	Salinity	35	39	38	39	38	39
	O2 (mg/l)	7	6	7	6	7	6
	PH	7	8.5	7	8.5	8	8.5
	Ammonia	1	2	1	2	1	2

was null in spring; therefore the mutual independence was assessed between the sampling y and zone directly, showing that both variables are independent ( $P>0.05$ ). Although there was no significant difference between sampled y it existed between the sampling zones; the northern zone showed the higher average prevalence (25%), followed by the center (15%) and southern zone (9%).

In those cases where the  $H_0$  about the mutual independence was rejected, a partial evaluation was performed to measure the degree of interaction between the presence of the diseases and the sampled zone or season. In all the cases where the null hypothesis was accepted, a sum was made with all the data and later contrasted through contingency tables (2x2) to evaluate the differences between y.

#### AHPND

The interaction tests between variables (zones, sampling season, and presence/absence of AHPND) rejected the  $H_0$  ( $P<0.05$ ), implying the existence of the interaction between the causal variables and at least one of the variables that is being responsible for the variation of the presence/absence of the disease in each y.

In 2016, there was no evidence of significant differences between the three sampling zones ( $P>0.05$ ) in the homogeneity test. Significant differences were only found for the sampling season, with the average prevalence of this disease being higher in spring (67%) than in summer (40%).

Contrary to the observations in the previous yrs in 2017 significant differences were found ( $P>0.05$ ) between sampling zones; the northern zone resulted with a higher prevalence (73.5%), followed by the central zone (57%) and southern zone (50%). No significant evidence was found ( $P=0.2018$ ) after evaluating the AHPND prevalence rate in the two y of the study, regardless of

the zone or season sampled.

#### NHPS

The interaction tests between variables (zones, sampling season, and presence/absence of NHPS) rejected the  $H_0$  of mutual independence ( $P<0.05$ ).

In 2016, there was no evidence of significant differences between the three sampling zones ( $P>0.05$ ) in the homogeneity test. Significant differences were only found for the sampling season, with the average prevalence of this disease being higher in summer (50%) than in spring (23%).

Despite not having found significant differences between zones for this disease, the northern zone showed a higher prevalence of NHPS in 2017 (47%), compared to the central (32%) and southern (32%) zones.

-Interaction evidence was not found during 2017 between the variables (sampling zone and season), thus accepting the mutual independence hypothesis. Moreover, there were no meaningful differences observed between zones, season ( $P>0.05$ ) or sampled y for this disease.

#### WSSV

In 2016, WSSV showed no evidence of significant variation between zones (north: 17%; central: 13% and south: 18%), but between seasons of that y, showing increasing prevalence in the summer (spring 10% - summer 22%). However, in 2017, not enough evidence was obtained to statistically sustain seasonal variations (spring 21% - summer 19%). Additionally, the homogeneity degree between zones remained still (north: 12%; center: 25% and south: 24;  $P=0.7094$ ). Differences between y were not observed ( $P=0.3375$ ).

### Physiochemical variables of ponds

The most relevant measurements of the physiochemical variables of the farming ponds are shown in TABLE III.

The discrete nature of the values measured hinders the possibility of their inclusion in the calculation of the disease prevalence variation as causal factors. Moreover, the values showed high collinearity and, in this regard, the variation of all variables greatly depend upon the season of the year (Spring/Summer), including the average weight of the organisms, which is logically a time-dependent variable.

The TABLE IV summarizes the values of the Pearson correlation.

### Interaction of diseases

TABLE IV  
COLLINEARITY ANALYSIS OF THE PHYSIOCHEMICAL VARIABLES AND THE SAMPLING SEASON (r=PEARSON CORRELATION COEFFICIENT)

Variables	r
Season vs. Average weight	1.00
Season vs. Ammonia	0.96
Season vs. pH	0.88
Season vs. Oxygen	0.80
Season vs. Temperature	0.79
Season vs. Salinity	0.73

The 85% of the total analyzed organisms exhibited at least one disease, while 55% of the organisms were affected with at least two diseases. It is difficult to establish a hypothesis about the causal relationship between one diseases with another. However, the percentage of concurrent incidence of two diseases was calculated (TABLE V).

AHPND and NHPS were the diseases with more prevalence in all the studied areas. Moreover, AHPND had the most significant impact on shrimp's health, judging by visible alterations in hepatopancreas through histopathology analysis. Severe stress

TABLE V  
PERCENTAGE (%) OF THE SIMULTANEOUS PRESENCE OF 2 DISEASES IN THE SAME ORGANISM

Diagnosis 1	Diagnosis 2	% Coincidence
AHPND	NHPS	19.72
NHPS	WWSV	9.44
NHPB	NHPS	8.89
AHPND	NHPB	7.78
AHPND	WWSV	6.94
NHPB	WWSV	2.50

and physical injuries exhibited by the shrimps, under unfavorable environmental conditions for farming, promote the organisms' susceptibility to some pathogens [14, 22]. Furthermore, the primary infection with AHPND probably weakened the organisms and made them more susceptible to the other infections reviewed in this study.

AHPND exhibited vermiform structures in the initial stage of the disease which is associated with the rupture of the membrane of the hepatopancreatic tubules [24]. Although this has not been reported previously for this disease in Asia [25], matches with the initial stage symptoms reported for this disease in Mexico [18, 23].

The results of the interaction of bacterial diseases are comparable with the reported by Lightner [13] in which different *Vibrios* are present in all marine crustaceans and become opportunistic pathogens when the natural defense of the host organism is suppressed or compromised. The stress derived from inadequate farming conditions is usually one of the most important factors that favor the development of disease in aquatic organisms, among which the presence of bacterial diseases [9, 13].

The members of the genus *Vibrio* have been associated with mortality of penaeid shrimps in several countries: *V. harvey*, *V. alginolyticu*, *V. parahaemolyticus*, and *V. mimicus* are some of the reported species linked to significant damage in all the stages of the farming of shrimp [10, 11, 13], *V. harvey*, *V. parahaemolyticus* and *Vibrio spp* have been reported in the hemolymph of apparently healthy shrimp, with an average load lower than  $1 \times 10^3$  CFU without causing mortality [10].

The increase in nutrient availability after disinfection in combination with a destabilized and impoverished microbial community favors the growth of bacteria [3]. Considering that a type of *Vibrio* causes AHPND, this practice promotes the proliferation of the agent that causes AHPND in the pond instead of preventing its development. The same issue was also observed with luminescent vibriosis during the first 10-45 d after storing the shrimp postlarvae in the growth ponds. The disease outbreak was preceded by a substantial increase in the number of opportunistic vibrios in the pond [11]. The rise occurred after the disinfection of the pond and was linked to a disturbed microbial community and the presence of nutrients [3, 21].

Although there were no significant differences in the physiochemical variables measured, the toxicity generated by the nitrogenated compounds and unsuitable temperatures for shrimp culture induce stress in the organisms, reducing appetite, greater body's energy expenditure, deficiency in metabolic processes and lower activity against opportunistic pathogens [6].

The presence of WSS in the studied zones indicated severity degrees of 1 and 2, without apparently compromising the health of the affected shrimp and discarding the direct association with

the low recorded survival rate. Regarding the lower prevalence of infection observed, it is probably due to better sanitary control in the larvae production laboratories, given that intensive sanitary campaigns have been promoted across the Country, and viral analyzes are currently carried out on the total number of broodstocks, which did not happen in the past. It is also possible that the low prevalence is due to an increase in AHPND, reported for the first time in 2013, causing mortalities of 100%.

Infections caused by intracellular or similar organisms in wild or farmed shrimp have been described [5]. However, the severe pathologies or epizootics associated specifically with NHPB, are only documented in Mexico, USA, Central and South America from 1986 until recent yrs [4, 8, 19]. The development of epizootics by NHPB has been reported in Texas (USA), Peru, Venezuela, Ecuador, Costa Rica, Mexico, Honduras, Nicaragua, Brazil, and Panama when there are prolonged periods of high temperatures (>29 -30C), together with high salinities (20-40gL<sup>-1</sup>). NHP can go unnoticed for days and suddenly become an out-of-control event [12, 15, 20].

## CONCLUSIONS

The 85% of all the organisms analyzed showed at least one disease and 55% at least two diseases. The disease with the highest prevalence on average for all the zones and seasons was AHPND with 53% in 2016 and 60.16% in 2017. NHPS was the second most prevalent with 36.66% in 2016 and 42.83% in 2017.

The prevalence of WSSV was relatively low compared to the rest of the diseases; 16.16% in 2016 and 20% in 2017. NHPB was only observed during the summer with a prevalence of 16.16% for both y.

The northern zone was the most affected since it had the highest prevalence of diseases excluding WSSV, which had a higher prevalence in the southern zone than in the other zones (however, this difference is not statistically significant).

The organisms with AHPND presented severe damage in hepatopancreas with cellular detachment of the proximal intestinal region. While the organisms with NHPS showed multifocal cellular detachment in hepatopancreas and presence of bacterial colonies in the hearth, gills, lymphoid organ, connective tissue, muscle and lymphoid organ, connective tissue, muscles, and blind liver spots.

The presence of bacterial and viral diseases identified in this study are considered to be related to the susceptibility of each organism or an inadequate culture environment, caused by physiochemical variables and organic matter accumulation; or by the alteration of the ecosystem caused by the usual practice of disinfection of ponds to eliminate potential pathogens or their carriers before depositing shrimp for their growth.

## FUNDING INFORMATION

This work was partially funded by CIAD grant 2017710219-MCMS.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors of this paper deny any financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. A handbook of normal penaeid shrimp histology. **World Aquac. Soc.** Pp 1-114. 1988.
- [2] BOYD, C.E. Consideraciones Sobre La Calidad Del Agua y Suelo. En: **Cultivos de Camarón. Métodos para mejorar la camaricultura en Centroamérica.** Centro Investigación de Ecosistemas Acuáticos (Nicaragua). 1<sup>ra</sup> Ed. Pp1-30. 2001.
- [3] BRATVOLD, D; LU, J; BROWDY, C.L. Disinfection, microbial community establishment and shrimp production in a prototype biosecure pond. **J. World Aquac. Soc.** 30: 422-432. 1999.
- [4] BRINES, B; ARANGUREN, L.F; SALAZAR, M. Fecal samples as DNA source for the diagnosis of necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in *Penaeus vannamei* broodstock. **Dis. Aquat. Org.** 55:69-73. 2003.
- [5] BROCK, J.A; NAKAGAWA, L.K.; HAYASHI, T.; TERUYA, S.; VAN CAMPEN, H. Hepatopancreatic rickettsial infection of the penaeid shrimp, *Penaeus marginatus* (Randall) from Hawaii. **J. Fish Dis.** 9: 353-355. 1986.
- [6] CUI, Y; REN, X; LI, J; ZHAI, Q; FENG, Y; XU, Y. Effects of ammonia-N stress on metabolic and immune function via the neuroendocrine system in *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immun.** 64: 270-275. 2017.
- [7] DEL RÍO-SALAS, M.L; MARTÍNEZ-DURAZO, A; JARAMARINI, M. E. La acuicultura y su impacto en la zona costera del Golfo de California. **Rev. Cien. Biol. Salud. Biotec.** 3: 37-46. 2016.
- [8] FRELIER, P.F; SIS, R.F; BELL, T.A; LEWIS, D.H. Microscope and ultrastructural studies of necrotizing hepatopancreatitis in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) cultured in Texas. **Vet. Pathol.** 29:269-277. 1992.
- [9] GNANA-SELVAM, D; MUJEEB-RAHIMAN, K.M; MOHAMED-HATHA, A.A. An investigation into occasional white spot syndrome virus outbreak in traditional Paddy cum Prawn fields in India. **Sci. World J.** 2012: 1-11. 2012.

- [10] GÓMEZ-GIL, B; TRON-MAYEN, L; ROQUE, A; TURNBULL, J.F; INGLIS, V; GUERRA-FLORES, A.L. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juveniles *Litopenaeus vannamei*. **Aquac.** 163:1-9. 1988
- [11] LAVILLA-PITOGO, C.R; LEAÑO, E.M; PANER, M.G. Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent *vibrios* in the rearing environment. **Aquac.** 164: 337–349. 1998
- [12] LIGHTNER, D. V. Diagnostic procedures for diseases in shrimp. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. **World Aquac. Soc.** Pp 1-220. 1996.
- [13] LIGHTNER, D.V; BELL, T.A; REDMAN, R.M; MOHNEY, L.L; NATIVIDAD, J.M; RUKYANI, A; POERNOMO, A. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimp of the Americas and Indopacific. In: Shariff, M.; Subasinghe, RP; Arthur, JR (Eds.). **Diseases in Asian Aquaculture**. I. Fish Health Section. Asian Fisheries Society. Manila, Philippines. Pp. 57-80. 1992.
- [14] LIU, C.H.; CHEN, J.C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish. Immunol** 16:321–334. 2004.
- [15] LIU, K. Histopathological study of the bacterial induced hepatopancreatitis of cultured shrimp (*Penaeus monodon Fabricius*). **Fish. Dis. Res.** 9:34-41.1989
- [16] MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Evaluación sanitaria de granjas camaronícolas con eventos de mortalidades asociados a la necrosis del hepatopáncreas en la región noroeste de México. Informe técnico final. CIAD-INAPESCA. Pp 1-15. 2014.
- [17] MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Evaluación sanitaria preliminar de granjas camaronícolas con eventos de mortalidades asociados a la necrosis del hepatopáncreas en la región noroeste de México. Informe técnico final. CIAD-INAPESCA. Pp 1-10. 2015
- [18] MORALES-COVARRUBIAS, M.S; GARCÍA-AGUILAR, N; BOLAN-MEJÍA, M.C; PUELLO-CRUZ, A.C. Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. **Dis. Aquat. Org.** 122: 57–65. 2016.
- [19] MORALES-COVARRUBIAS, M.S; RUIZ-LUNA, A; PEREIRA, MOURA-LEMUS, A; SOLIS-MONTIEL, V.T; CONROY, G. Prevalencia de enfermedades de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) cultivado en ocho regiones de Latinoamérica. **Rev. Cientif. FCV-LUZ XXI** (5): 434-446.2011.
- [20] MORALES-COVARRUBIAS, M.S; OSUNA-DUARTE, A.G; GARCIA-GASCA, A; LIGHTNER, D.V; MOTA-URBINA, J.C. Prevalence of necrotizing hepatopancreatitis in female broodstock of *Penaeus vannamei* with unilateral eyestalk ablation and hormone injection. **J.Aquat. Anim. Health.** 18:19-25. 2006.
- [21] NATRAH, F.M.I; BOSSIER, P; SORGELOOS, P; YUSOFF, F.M; DEFOIRDT, T. Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. **Rev. Aquac.** 6: 48–61. 2014.
- [22] PRAYITNO, S.B; LATCHFORD, J.W. Experimental infections of crustaceans with luminous bacteria related to Photobacterium and *Vibrio*. Effect of salinity and pH on infectiosity. **Aquac.** 132:105–112. 1995.
- [23] SOTO-RODRIGUEZ, S.A; GOMEZ-GIL, B; LOZANO-OLVERA, R; BETANCOURT-LOZANO, M; MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Field and experimental evidence of *Vibrio parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. **Appl. Environ. Microbiol.** 81 (5): 1689–1699. 2015.
- [24] SRIURAIRATANA, S; BOONYAWIWAT, V; GANGNONNGIW, W; LAOSUTTHIPONG, C; HIRANCHAN, J; FLEGEL, T.W. White Feces Syndrome of Shrimp Arises from transformation, sloughing and aggregation of hepatopancreatic microvilli into vermiform bodies superficially resembling gregarines. **PLoS ONE** 9(6): e99170. 2014.
- [25] TRAN, L; NUNAN, L; REDMAN, R.M; MOHNEY, L.L; PANTOJA, C.R; FITZSIMMONS, K; LIGHTNER, D.V. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **J. Dis. Aquat. Organ.** 105: 45–55. 2013.
- [26] ZUUR, A; IENO, E.N; WALKER, N; SAVELIEV, A. A; SMITH-GRAHAM, M. Limitations of linear regression applied on ecological data. **Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R.** Vol. 53. Pp 11-33. 2009.

# BIODIVERSITY OF ACTIVE TOXINS AND PROTEOMIC ANALYSIS OF LANSBERG'S MAPANARE (*Porthidium lansbergii hutmanni*) VENOM SNAKE AND ITS IMPACT ON ENVENOMING

## *Diversidad Bioquímica De Las Toxinas Activas Y El Análisis Proteómico Del Veneno De La Serpiente Mapanare De Lansberg (Porthidium lansbergii hutmanni) Y Su Impacto En El Envenenamiento*

María Eugenia Pineda<sup>1</sup>, Alba Marlene Vargas<sup>1</sup> and Alexis Rodríguez-Acosta<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Biotecnología de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. mariupinex@gmail.com; avapino1104@gmail.com<sup>2</sup>Laboratorio de Inmunoquímica y Ultraestructura del Instituto Anatómico, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. rodriguezacosta1946@yahoo.es Immunochemistry and Ultrastructural Laboratory of the Anatomical Institute, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Email: rodriguezacosta1946@yahoo.es

### ABSTRACT

The venom characterisation of Lansberg's hognose viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) was described using a combination of SDS-PAGE and 1 and 2d electrophoresis, MALDI TOF/TOF and tandem mass spectrometry (LC-MS / MS), as well as some proteolytic activities. This study shown the existence of metallo and serine proteases, cysteine-rich proteins (CRISPs), and L-amino acid oxidases (LAAOs), which appeared in variable amounts. It was also described, for the first time in this venom, the presence of the glutaminil-cyclase (vQC) that had been only before observed in species of *Crotalus atrox*, *C. godmani*, *C. d. terrificus* and *M. fulvius* of the American continent, but not in *Porthidium* genus. The presence of toxins with a gelatinolytic and caseinolytic activity was also defined. The crude venoms are excellent sources of enzymatic and non-enzymatic actions, which should be purified and characterised with the aim of their possible use as therapeutic agents, in antitumor and haemostatic treatments.

**Key words:** Lethality; MALDI-TOF/TOF; *Porthidium lansbergii hutmanni*; proteolytic; proteomic; LC-MS/MS; venom

### RESUMEN

La caracterización del veneno de la serpiente Mapanare de Lansberg (*Porthidium lansbergii hutmanni*) se realizó utilizando una combinación de electroforesis (SDS-PAGE) de una y dos dimensiones, por MALDI TOF / TOF y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), así como algunas actividades proteolíticas usando caseína y gelatina. Este estudio reveló la existencia de metalo y serino proteasas, proteínas ricas en cisteína (CRISP) y L-aminoácido oxidasas (LAAOs), que aparecieron en cantidades variables. También se describió, por primera vez en este veneno, la presencia de la glutaminilciclase (vQC) que solo se había observado anteriormente en especies de *Crotalus atrox*, *C. godmani*, *C. durissus terrificus* y *M. fulvius* del continente americano, pero no en el género *Porthidium*. También se definió la presencia de toxinas con actividades gelatinolítica y caseinolítica. Los venenos crudos son una excelente fuente de acciones enzimáticas y no enzimáticas, que deben ser purificadas y caracterizadas con el objetivo de su posible uso como agentes terapéuticos, en tratamientos antitumorales y hemostáticos.

**Palabras clave:** Letalidad; MALDI-TOF/TOF; *Porthidium lansbergii hutmanni*; proteólisis; proteómica; LC-MS/MS; veneno

## INTRODUCTION

Lansberg's hognose viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) (*P.l.h*) snakebite is an important medical condition in Margarita and Coche Islands (Nueva Esparta State, Venezuela) [17]. This venom experimentally produces oedema, necrosis, bleeding (skin bruising, gastrointestinal haemorrhage and haematuria) and lymphatic vessel damage, with degradation of extracellular matrix effects [17, 43]. The development of *P.l.h* snakebite has been roughly studied, and the basic pathogenic mechanism of this envenomation remains an open question. It has been generally assumed that haemostatic complications were linked to serine and metalloproteases activities, but this venom is a cocktail of toxins with various enzymatic and non-enzymatic molecules, which are responsible for the numerous symptoms and signs that express the patients, which are caused by the pathophysiological venom action. Therefore, it is helpful to explore by proteomics methods the *P.l.h* venom to find the *P.l.h* snakebite-associated biomarkers for addressing the mechanism of this envenomation. A comprehensive view offered by general proteomics can provide novel insights into the etiology of *P.l.h* snakebite and identify new opportunities for the prediction, prevention, and treatment of this accident. New findings in mass spectrometry technologies have transformed the global vision of the measurement of isolated molecules, peptides, or total proteins up to a broad analysis of all the protein components that make up cellular cells and how they relate and function orchestrated. Mass spectrometry has become a methodology that answers many analytical questions, in order to try to dissect the molecular complexity of biological entities [4,7].

In the present work, it was initiated a proteome and mass spectrometry technologies studies from samples of *P.l.h*, venom using SDS-PAGE and 2 dimensions (2D) electrophoresis, MALDI/TOF/TOF and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), as well as particular proteolytic activities, in order to isolate and characterise toxins that have relevant activities, which could be useful in medical therapy, such as coagulation and cancer disorders.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Electrophoresis: Reagents (BIO-RAD, USA), IPG Strips pH 3-10, 11 cm (BIO-RAD, USA); casein (Merck and Riedel de Haen, Germany); Immunoblotting: Equine peroxidase-coupled-equine IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Nitrocellulose membrane (BIO-RAD, USA), SuperSignal West Pico® chemiluminescence development kit (ThermoScientific, USA); MALDI-TOF/TOF:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix ( $\alpha$ -CHCA) (SIGMA, Mo, USA), Acetonitrile, Trifluoroacetic Acid and diethyl ether (SIGMA, Mo, USA); LC-MS / MS: OFFGEL RoomTemp HighRes® Kit (Agilent Technologies, USA), IEF pH 3-10 24 centimetres (cm) strips (GE Healthcare, USA), Swine Trypsin (PROMEGA), Electro spray calibrate solution 63606 and

Calibration Tune Mix ESI (SIGMA-Fluka, USA ); working solutions: reagents of high purity  $\geq 98\%$  (Merck and Riedel de Haen, Germany).

### Software

For the statistical analyses, the Prism® program (GraphPad, Software) [60] was used; for the one dimension gels analysis, QuantityOne® (BIO-RAD, USA) software was utilised; while for the two-dimensional gels electrophoresis analysis, the PDQuest® program (BIO-RAD) was employed [48].

In the MALDI/TOF mass spectrometry experiments, Compass 1.2 SR1 for Flex Analysis (BrukerDaltonics) software was used. The LC-MS/MS analyses the Compass 1.2 SR1 program for Microtof / Maxis® (Bruker-Daltonics) was utilised [9].

### Experimental animals

Male mice (*Mus musculus*) (NIH strain) weighing 20 to 22 grams (g) were purchased from the National Institute of Hygiene "Rafael Rangel" (Caracas, Venezuela) animal facility. The mice were kept in cages under room temperature conditions, twelve hours (h) natural light with water and food *ad libitum* until used.

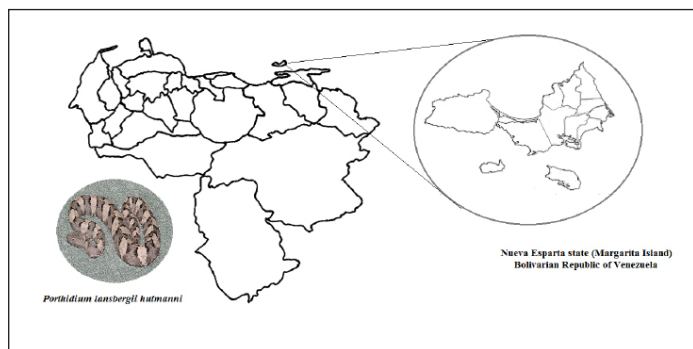
### Ethical statement

Trained staff prepared all the experimental methods relating to the use of live animals. Applicable regulations as well as institutional guidelines, according to protocols approved by the Institute of Anatomy of the Universidad Central de Venezuela Ethical Committee, following the norms obtained from the guidelines for the care and use of laboratory animals, published by the US National Institute of Health [38].

### Venom

*Porthidium l. hutmanni* (*P.l.h*) venom was obtained by manual milking of 11 adult specimens of both sexes, from Margarita Island, Nueva Esparta State (Venezuela), geographically located at 10° 51 '50 " - 11° 11' 06" NL 63° 46 '40 " - 64° 24' 32" WL. The island has ~ 1150 square kilometres (km<sup>2</sup>) (115.000 hectares (Ht) of territory (FIG.1), which represents 0.13% of the national land. The *P.l.h* snakes have been trapped throughout the insular territory and the environment where it lives has particular physical and natural characteristics. The climate has produced a mixture of ecological areas from the tropical desert brushwood, in the low and dry zones, with a wide range of altitudinal floors of mountains, and tropical dry forest, roofed by the trade winds ("vientos aliseos" [2]. The area of the island with greater precipitation corresponds to the piedmont zone ("Cerro Copey"), which is a premontane humid forest, with average annual temperatures of 28°C and an atmospheric humidity of around 50%. The annual rainfall is less than 500 millimetres (mm). The few rains cause superficial and underground water resources to be scarce, because in spite of the existence of geological conditions conducive to their storage,

the recharge is not significant [41]. All snakes were taken to the Research Laboratory Serpentarium, Faculty of Pharmacy of the Universidad Central de Venezuela. The snakes were milked upon reaching the Serpentarium, after their adaptation for a week (w). The venom, once obtained, was crystallised under vacuum in a desiccator containing  $\text{CaCl}_2$  as a desiccant, and maintained at 4 ° C (Frigidaire FGVU21F8QF Vertical Freezer, USA), until its subsequent use.



**FIGURE 1. *Porthidium lansbergii hutmanni* GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION IN MARGARITA ISLAND (VENEZUELA)**

#### Protein determination

The protein venom content was determined by Lowry *et al.* method [30].

#### Lethality determination

Five groups containing 5 mice weighing 18–22 g were used to determine the  $\text{LD}_{50}$  for *P.l.h* venom. The mice were intraperitoneally injected with 200 microlitres ( $\mu\text{L}$ ) of serially diluted sample ranging from 17.33 to 132 micrograms ( $\mu\text{g}$ ). Deaths during a 48-h period were recorded. The  $\text{LD}_{50}$  was calculated by the Spearman-Kärber method [49].

#### Proteomic characterization of the *P.l.h* venom

##### SDS-PAGE analysis of venom

Twelve percent (12%) of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were carried out following Laemmli. [26] method. Briefly, *P.l.h* venom sample was dissolved at a concentration of 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  in a protease inhibitors cocktail, composed of 4-(2-aminoethyl)-benzene-sulphonyl fluoride (AEBSF), E-64, bestatin, leupeptin, aprotinin and disodium EDTA and then diluted to the optimum concentration for visualisation (venom: 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), in 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 6.8, 10% SDS, 1% glycerol and 0.02% bromophenol blue. A 5  $\mu\text{L}$  aliquot of the sample and 5  $\mu\text{L}$  of pre-stained markers of wide molecular weight range were distributed into the gel. The samples were subjected to the electric constant current of 100 volts (V) until complete the run (about 120 min). Afterward, the relevant gels selected for staining were placed in

a solution containing 12% volume/volume (v/v) phosphoric acid, 10% weight/volume (w/v) ammonium sulphate, 20% v/v methanol and 0.12% w/v Coomassie G-250 blue, according to Blue Silver staining protocol [8], which has a sensitivity of 1 nanogram (ng) per band. Then, the gels were washed with deionized water to remove excess dye, and digitised by densitometry (Densitometer GS-900™ Bio-Rad, USA). Each experiment was performed in duplicate.

#### Two-dimensional (2D) electrophoresis of *P.l.h* venom

In order to have the proteomic map of the *P.l.h* venom, two-dimensional (2D) electrophoresis was performed. The analysis of the venom was carried out in duplicate to obtain two gels per sample. The methodology consisted in the dissolution of 100  $\mu\text{g}$  of *P.l.h* venom, in 50  $\mu\text{L}$  of protease inhibitors cocktail. In turn, 150  $\mu\text{L}$  of 8M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 20 millimolar (mM) DTT and 0.5% v/v of a commercial ampholyte mixture were added. The resulting solution was placed on a commercial strip that contained immobiliser on its surface, a linear pH gradient comprised between pH 3 and pH 10, which were used for the determinations. After electrophoresis, one lane was removed from the unstained gel, and incubated in SDS sample buffer containing 3% 2-ME for 30 min. This treated gel strip was then relocated to the top of a second 12.5% SDS gel, before electrophoresis in the second dimension. The obtained gels were stained with Blue Silver [8]. They were digitised by densitometry, and the images obtained were analysed, in order to estimate the isoelectric point and the molecular weights of the visualised spots.

Those spots visualized in the gels, but not in all of the gel that formed the experiment, were taken into account for the results of this work. The differences between the intensity of the spots were not compared, i.e. the analysis was only performed from a qualitative perspective.

#### Proteomic analysis by Matrix-Assisted Laser (MALDI TOF TOF) of *P.l.h* venom

This assay was carried out in the Proteomics Unit, Structural Biology Centre, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). For the *P.l.h* venom analysis by mass spectrometry (MS) [32], the proteins venom was initially separated by 10% SDS-PAGE electrophoresis under reducing conditions. Then, the gel was stained with Coomassie blue staining. After the bands visualisation, small portions of them were cut and each of these fragments was destained with 30% acetonitrile (ACN) and 250mM ammonium bicarbonate. At that point, they were dehydrated with aqueous solution at 90 % of ACN and subsequent digestion of proteins, by incubation of the gel fragments at 37°C for 18 h, covering them with a solution of 12.5 ng/ $\mu\text{L}$  trypsin in 50mM ammonium bicarbonate. The tripeptide peptides obtained were concentrated and purified by using ZIP-TIP C18® tips, using an aqueous solution containing 60% ACN and 1% formic acid as eluent. The ionisation of the samples for mass spectrometry analysis was carried out by MALDI (Matrix-

Assisted Laser Desorption / ionisation). Each sample was mixed in a 2: 1 ratio with a suspension of  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid ( $\alpha$ -CHCA), prepared in 50% ACN and 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) and allowed to dry over a MALDI plate, at room temperature until their complete crystallisation.

The analysis by mass spectrometry was performed on a spectrometer equipped with a TOF/TOF (Time-Of-Flight/ Time-Of-Flight) type analyser, operated in a reflectron mode. The peptides MS/MS analysis that generated the most intense signal was carried out using the MASCOT program (MS/MS Ion Search®, MatrixScience) [32] with the following parameters: Taxonomy: AllEntries, Variable modifications: oxidation (M), deamidated (NQ), Fixed Modifications: propionamited (C); against the database of the NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). In addition, the peptide alignment sequences obtained through the manual interpretation of the spectra was performed, with non-redundant sequences through the BLAST® program (NCBI), considered as valid, those results with an E-Value <1E-04.

#### Proteomic analysis by liquid chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS / MS) of *P.l.h* venom

In order to obtain more proteomic information *P.l.h* venom was subjected to liquid chromatography, coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS). Briefly, 100 microgram ( $\mu$ g)/100 microliters ( $\mu$ L) of venom was incubated for 15 minutes (min) with 5 millimol (mM) DTT and subsequently for another 15 min with 10mM iodoacetamide. Afterward, the sample was incubated at 37°C with trypsin in a 1:40 ratio enzyme: substrate. The obtained sample composed of a mixture of triptych peptides, was placed in a fractionator (3100 OFFGEL Fractionator, Agilent, USA), for the fractionation of these peptides according to their isoelectric point. The products obtained were recovered in 24 liquid phase fractions of 150 $\mu$ L each. A linear fixed gradient strip of pH 3-10 of 24 centimeters (cm) was used. During the process, a voltage/hour ratio of 50 kilovolts (kV) was reached at a 4500 V. Current: 50 microAmpere ( $\mu$ A) and Power: 200 microWatts (mW). Then, the fractions obtained were injected into a high performance chromatographic system, equipped with a C18 reverse phase precolumn (5  $\mu$ m and 2 cm in length) and a C18 chromatographic column (5  $\mu$ m and 10 cm in length). A linear gradient was established between a solution Phase A: composed of 0.1% formic acid in deionized water and a solution Phase B: composed of 0.1% formic acid in ACN. This gradient was increasingly established from 0% from Phase B to 80% from Phase B in 60 min. Each of the eluates continued through an interface coupled to a tandem mass analyser (MS/MS) time of flight-quadrupole. The ionization of the peptides was performed by ESI (Electrospray ionization) with voltage in the capillary of -4500V, Gas flow desolvation: 2L/min, Gas nebulizer: 5.8 psi and temperature: 160°C. The mass range analysed was 50-3000 Da/z. Calibration was carried out using a commercial calibrator solution. The analysis and searches of the obtained monoisotopic masses for the peptide fragments were carried out according to MALDI TOF/TOF.

### Evaluation of the proteolytic activity of *P. l. h* venom

#### Determination of proteolytic activity on gelatine

The methodology proposed by Terra *et al.* [53], with minor modifications was followed. Discontinuous 12.5% polyacrylamide gels copolymerized with 1% gelatine were run. The *P.l.h* venom and samples were prepared at a concentration of 2  $\mu$ g/ $\mu$ L in 0.5 M Tris buffer, pH 6.8, 10% SDS, 1% glycerol and 0.02% bromophenol blue, placing 3 $\mu$ L of each sample in the gel. In addition, as positive control, 1  $\mu$ L (2  $\mu$ g/ $\mu$ L) of *Bothrops colombiensis* venom was added. Then, after electrophoresis, the gel was equilibrated in a 2.5% Triton X-100 solution, under stirring for 1 h at room temperature, washed with double distilled water (two washes of 10 min each) and incubated at 37°C for 18 h, in a buffer solution Tris-HCl 20 mM pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>. The proteolytic activity on gelatine was evidenced by zones of degradation in the gel, generated by the gelatine staining with Coomassie R-250 Blue, which were presented as translucent areas on a blue background.

#### Determination of proteolytic activity on casein

Proteolytic activity was carried out using casein (40 $\mu$ g) as substrate. Briefly, 1mL of 1% casein in Tris HCl 0.2M buffer, pH 8.5 and (5  $\mu$ g/0.05 mL) of *P.l.h* venom. The reaction mixture was incubated for 15 min at 37°C, stopping the reaction with 0.44 M trichloroacetic acid (TCA) at 5°C for 30 min. Then, the sample was centrifuged (Beckman Avanti 30, USA) at 5000xg for 10 min. The specific activity was measured by the formation of acidic products soluble at 280 nm, converting the values of optical density (OD) (280 nm) to  $\mu$ g of L-tyrosine measured at 660 nm 5 and expressed in units of activity/mg of protein.

#### Statistical analysis

In the case of differences between experimental groups, the comparison was made using one-way Analysis of Variance (ANOVA), using as a statistical test, the Dunett test considered as significant those results with an error probability P <0.01. Analysis was completed using SPSS version 2.0 [35]

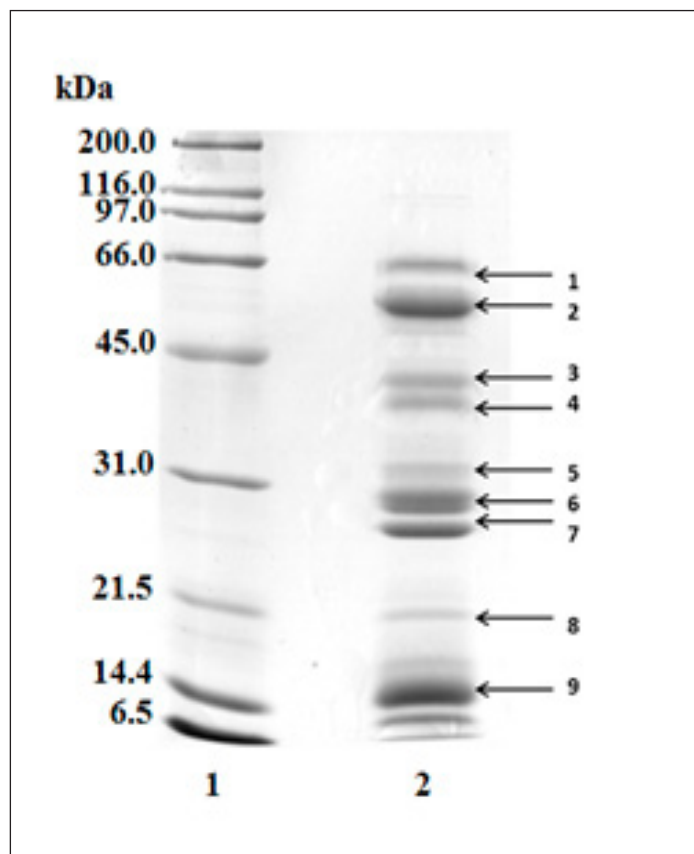
### RESULTS AND DISCUSSION

Proteomic approach has permitted far-reaching studies of protein expression in different venoms in isolated conditions and/or time situations. New improvements of procedures in this area have initiated new opportunities to achieve applicable information on toxinology processes. In the current work, the focal proteomics techniques and their application to *P.l.h* venom analysis were studied.

One of the limitations of the MALDI-TOF system is the difficulty in detecting low molecular weight proteins, which because of this characteristic, generate few peptides (FIG.2). The system is also not able to detect more than one component of a mixture [9] that



is why it was combined several protein exploration methods to obtain better information.



**FIGURE 2. SDS-PAGE OF *P.l.h* UNDER REDUCING CONDITIONS FOR MALDI/TOF-TOF. The arrows indicate the cut bands for analysis by MALDI/TOF-TOF**

*Porthidium lansbergii hutmanni* found in Margarita Island (Venezuela) is the most common venomous snake in this region [17]. Its venom is quite moderate as compared to the rattlesnake *Crotalus durissus cumanensis* described in the same areas [17]. The venoms of *Porthidium lansbergii hutmanni* and *Crotalus durissus cumanensis* lethality showed LD<sub>50</sub> value of 2.51±0.16 mg/kg, respectively, on experimental animals inoculated intraperitoneally. In mammals, *Pl.h* venom can produce numerous pathological effects, such as local pain, haemorrhage, oedema, blistering, necrosis, lymphatic vessel damage and degradation of extracellular matrix [17]. Commonly, its envenomation is not considered a threat to an adult person because of its small size and the little amount of injected venom [17, 43]. However, *Pl.h* venom toxins cause muscles necrosis, the cascade coagulation activation or blockade of some of their factors. Tissue damage happens by endothelial cells injury, habitually produced by phospholipases A<sub>2</sub> and metalloproteases, interfering with homeostasis on diverse levels. Metalloproteases enzymes produce haemorrhage damaging of many constituents

of vessel walls extracellular matrix proteins, such as laminin, nidogen, fibronectin, collagen type IV and proteoglycans from the endothelial basal membrane, besides cleavage of large proteins such as fibrinogen [22], favouring the dissemination of venom fractions through the cell membranes [14]. In this venom, phospholipases A<sub>2</sub> display myotoxic and haemotoxic activities, causing local and systemic degeneration of the skeletal muscles by hampering the integrity of the muscle cell membranes [17]. Haemostatic activity of phospholipases involves the inhibition of blood coagulation factor cascade [11] synergistically acting in conjunction with serine proteases, which effectively disturb the coagulation victim system, affecting components of blood coagulation system, fibrinolysis, and platelets function [41].

The venoms from Viperidae family description have showed contain up more than 100 proteins fit in restricted protein families [5]. When *Pl.h* venom was run on 2DE gels 101 spots were found. As soon as the identification using MALDI TOF/TOF was carried out, less than 5 protein families were established. It could be argued that these proteins are highly modified post-translationally, an occurrence frequently described for Asiatic and South American snakes of Viperidae family. This was evidenced by the clearly visible spot sequences in the gels [6,48,55].

For separation of *Pl.h* proteins by one dimension (1-DE) SDS-PAGE and two-dimensional (2-DE) methods, it was necessary to isolate the molecules from fresh crude venom that allowed having good electrophoretic results. The *Pl.h* proteins needed to be denatured, disaggregated, solubilized, and treated to reduce disulphide bridges. The SDS-PAGE of *Pl.h* venom showed several venom bands at locations in which the high molecular weight metalloproteases and L-amino acid oxidase (LAAO) are frequently described [31]. Here was also observed a larger presence of bands on metalloproteases and LAAO locations, more than phospholipases. Previously, the presence of these two groups in almost similar amounts had been reported [18,20,48]. FIG. 3 shows the *Pl.h* venom electrophoretic profiles. The distribution of protein bands occurred within gel regions corresponding to wide molecular weights range. In this venom 11 protein bands were evident. The high intensity corresponded to the ~ 60, 54, 29, 26 and 12 kDa molecular weights. The lower intensity bands corresponded to 45, 39, 36 and 20 kDa. In the high molecular weight region only two low intensity bands of 170 and 140 kDa were evident.

The two-dimensional electrophoresis was carried out with *Pl.h* crude venom, which was separated in two successive steps. The isoelectric focusing (IEF), where the molecules migrate on pH gradient polyacrylamide gel immobilised by amphoteric buffers to achieve a point (pH) where its charge was equivalent to zero (isoelectric point or pI). Then, the venom proteins were yield to an electrophoresis with perpendicular direction to IEF on polyacrylamide gel sodium sulphate electrophoresis (SDS-PAGE), being separated agreeing with its molecular weight. In the example of 2-DE gels, 101 spots (FIG. 4 and TABLE I), each

**TABLE I**  
**MOLECULAR WEIGHTS AND ISOELECTRIC POINTS (IP) ANALYSIS OF THE TWO-DIMENSIONAL (2D) PROTEIN SPOTS IN A PROTEOMIC MAP OF *P.l.h* VENOM**

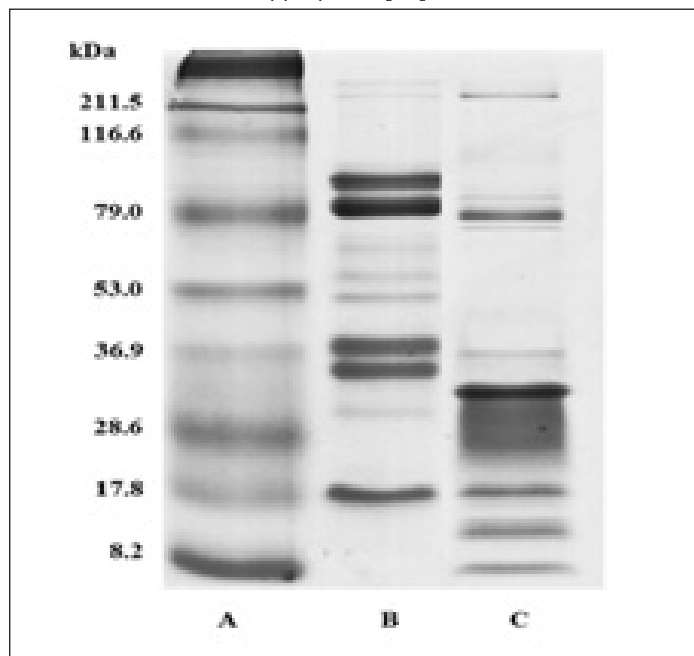
<b>Molecular weight</b>	<b>Isoelectric Point</b>	<b>Molecular weight</b>	<b>Isoelectric Point</b>	<b>Molecular weight</b>	<b>Isoelectric Point</b>
10.67	5.33	34.27	6.62	64.89	7.82
10.69	5.97	34.31	5.65	65.30	7.24
10.75	5.60	34.33	5.43	65.40	7.37
10.76	5.13	34.49	6.38	65.67	7.10
11.12	9.99	34.81	7.70	65.99	7.54
11.82	8.70	34.83	7.34	66.35	6.99
12.90	9.96	35.29	6.61	66.48	7.70
16.17	6.89	35.33	6.38	66.60	7.22
16.72	6.51	35.46	8.33	66.75	7.99
21.93	4.88	35.49	6.15	66.76	8.09
29.67	6.10	35.58	6.78	66.95	6.89
29.69	6.36	35.70	8.75	67.43	7.09
29.69	5.87	35.94	5.82	67.94	7.37
29.72	6.58	35.95	5.48	68.12	7.23
29.78	5.53	35.95	5.64	68.35	7.00
29.79	4.93	35.97	5.30	68.57	7.55
29.84	5.23	36.08	6.14	72.57	5.60
29.87	6.78	39.51	6.40	72.71	5.80
31.60	6.10	43.25	8.49	72.90	5.51
31.83	6.34	45.12	6.81	73.01	5.70
32.32	6.09	45.26	7.16	73.24	8.39
32.46	5.85	45.27	9.98	73.31	8.18
32.54	6.34	45.34	6.98	73.33	8.63
32.63	5.65	46.11	10.00	73.69	9.90
32.66	4.99	47.02	8.98	74.39	8.00
32.75	6.58	47.22	8.46	74.70	8.63
33.60	5.89	49.05	10.00	74.82	8.39
33.64	5.47	51.90	10.00	74.90	8.02
33.65	6.90	56.39	7.58	74.93	8.19
33.66	5.68	63.74	7.37	75.06	7.37
34.19	6.90	63.82	8.12	75.30	9.90
34.21	5.25	64.30	3.00		

enclosing one or more proteins, and various post-translational modifications were simply distinguished in the form of sequences of spots, aligned on the vertical or horizontal axis.

Then, in the gels using computer programs [35], the background material was taken away. The spots were compared and the data analysed for quantification of protein volumes or intensities. Regarding two-dimensional electrophoresis (2D), this was used to preliminary study the of *P.l.h* proteome. The *P.l.h* venom proteins

isoelectric focusing and its subsequent run on polyacrylamide gel were achieved. Then, the two-dimensional proteomic venom map was obtained (FIG. 4). One hundred and one protein spots were showed in the experimental gels, distributed in a range between 10.67 and 75.30 kDa, which had predominance between ~ 30-40 kDa (42.10%) and 60-80 kDa (35.80%), and in smaller proportion in ~ 41-59 kDa (11.60%), 10-20 kDa (8.40%) and 21-29 kDa (1%) molecular weights. All proteins showed isoelectric points with values between 4.9 and 10, predominantly in the pI <7.5 range

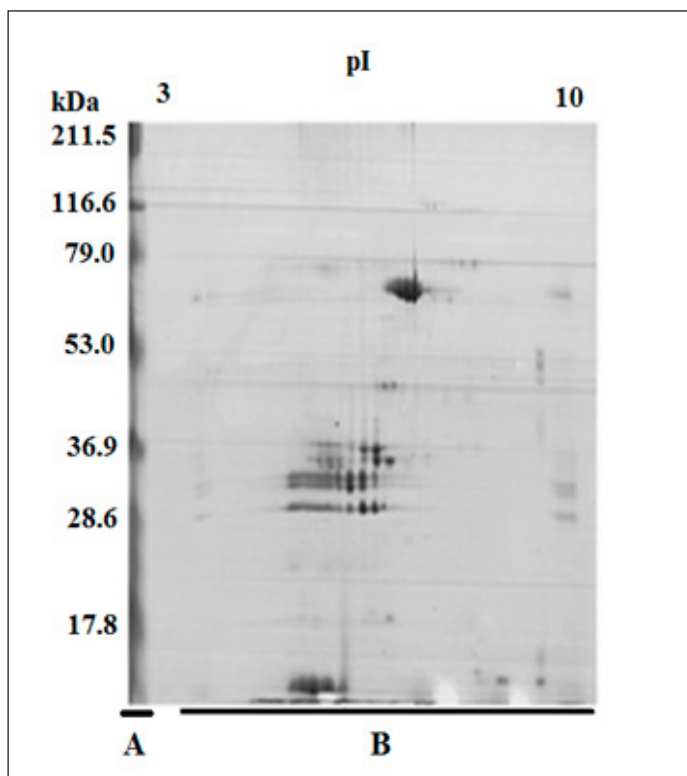
(66.31%). The location of these spots on the protein map of *P.l.h* venom is illustrated in FIG. 4, while their molecular weights and isoelectric points are summarized in TABLE I. The combination of 2D and proteomic analysis by MALDI TOF/TOF examination of post-translational protein modification discovery was carried out. Additionally, the 2D assay for high-molecular mass protein examination was more appropriate [56].



**FIGURE 3. SDS-PAGE OF VENOMS. A) MOLECULAR WEIGHT MARKER; B) *P.L.H* VENOM; C) *B. colombiensis* Venom**

In the present work, proteomic analysis of *P.l.h* venom by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and MALDI TOF/TOF showed that the metallo and serine proteases, cysteine-rich proteins (CRISPs)[44], LAAOs, and glutaminil-cyclase (vQC) occurred in variable amounts [TABLE II].

The 2D electrophoresis identified components fluctuating between 10.67 and 75.30 kDa, and molecular mass ranging from 8 to 116 kDa (FIG. 3). Several horizontal series of spots were observed. A total of ~ 101 spots were saved for analysis from diverse regions of the gel. TABLE III summarizes the results obtained from *P.l.h* venom by analysis by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). During the analysis it was possible to identify several proteins, most of them corresponding to L-amino acid oxidases (LAAOs) forms, metallo and serine proteases, cysteine-rich proteins (CRISPs), and glutaminil-cyclase (vQC). The presence of a protein serine protease-like, with ability to induce platelet aggregation, and a protein rich in cysteine residues, which revealed similarity with a domain rich cysteine toxin called Piscivorin was also determined.



**FIGURE 4. TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS IMAGE OF THE VENOM OF *Porthidium. l. hutmanni* VENOM (A) molecular weight markers. (B) *P.l.h* venom. Two hundred micrograms was run on an isoelectric focusing (IEF) (pH 3 to 10) and 12.5% SDS-PAGE (m/v), developed by Coomassie blue staining**

The CRISPs are responsible for disturbing homeostasis through several mechanisms, counting inhibition or activation of some factors in blood coagulation and blocking ion channels [34, 58, 59]. These proteins also can produce a deadbolt of the calcium and potassium channels and thus, the inhibition of smooth and skeletal muscles contraction and alteration of sanguineous vessels [57].

Here, cysteine-rich venom proteins (CRISPs) exhibited low abundance in analysed samples. This protein had been previously identified in this genus [21]. CRISPs also have broadly distribution in the venoms of the most important snake's families (Viperidae, Elapidae and Colubridae) [13,57]. It is generally described in Viperidae as a single protein [43]. These snake venom secretory proteins are a group of proteins, which are capable of disrupting homeostasis through various mechanisms, including inhibiting or activating factors in blood coagulation, blocking ion channels and displaying neurotoxic activity [13,34,58].

L-amino acid oxidases (LAAOs) in *P.l.h* venom were evident in the SDS-PAGE (> 100 kDa), mass spectrometry LC-MS/MS and mass spectrometry MALDI/TOF-TOF. Crotalid venoms are the richest sources of L-amino acid oxidases with the

TABLE II  
IDENTIFICATION OF THE *P.I.h* VENOM PROTEINS BY MASS SPECTROMETRY MALDI/TOF-TOF

Identification			BLAST analysis			
Bands	Sequence	Identified Protein	Taxonomy	Score BLAST	E value	% sequence
2	<b>identified peptide</b> R.ETDYEEFLEIAR.N	GI:347595686 GI:347602321 Y 34 more	<i>Protobothrops flavoviridis</i> <i>Bothrops jararaca</i>	50.3	3e-07	100
2	R.NDEEGWYANLGPMR.L	L-aminoacid oxidase GI:82090465 GI:33355627 Y 51 more	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	58.3	9e-09	100
3	IYEIVNTLNVIYR	L-aminoacid oxidase GI:82228618 GI:297593940 VLAIP-B	<i>Macrovipera lebetina</i> <i>Echis coloratus</i>	47.3	3e-05	100
4	R.YIELVIVADHR.M	Zinc-Metalloprotease GI:308212508 GI:332321851 Y 94 more Jerdonitin	<i>Bothrops neuwiedi</i> <i>Crotalus viridis viridis</i>	47.7	2e-05	100
6	R.NPEIQNEIIDLHNYLR.R	Zinc-Metalloprotease GI:46395675 and 58 more Tripurin Protein rich in cysteine	<i>Trimeresurus purpureo maculatus</i>	64.7	4e-12	100

exception of some *C. scutulatus scutulatus* [52]. Concerning, *Porthidium.l.hutmanni* venom composition, it varies in its own family and individual snake venom, which contains more than one type of LAAOs [12,51]. They also have distinct molecular masses [12,32] and functions [37,54]. LAAOs can lead to apoptosis of vascular endothelial cells in some tumours by its ability of producing hydrogen peroxide during amino acid oxidation in catalysed reactions [54]. This group of proteins also influence platelet aggregation inducing haemorrhages [45].

In the current work, *P.I.h* venom also have demonstrated by mass spectrometry and SDS-PAGE that the prevalent cluster

of proteins of *P.I.h* venom were the metalloproteases, which as is already recognised, it exists in high amounts in the Viperidae venom, but also they have been described in Elapidae and Colubridae families [27,36]. The description of Snake Venom Metalloproteases (SVMPs) proposed three basic groups (from P-I to P-III) established on their protein domain [14]. The spectrum of activity of these enzymes is very wide, but all are directly or indirectly involved in the haemostasis disorders. In this venom were seen metalloproteases belonging to all three groups, some of them may be implicated in haemorrhagic effects, fibrinogenolysis, inhibition of platelet aggregation, activation of prothrombin and factor X, and acting on inhibitors of serine proteases [14,36,45],

TABLE III  
IDENTIFICATION OF *P.L.H VENOM* PROTEINS BY MASS SPECTROMETRY LC-MS / MS

Identification				BLAST analysis		
Fraction	Peptide	Identified Protein	Taxonomy	Score	E	% sequence
	Sequence			BLAST	Value	
1	K.DCADIVINDLSLIHQPK.E	GI:426205815	<i>Crotalus durissus</i>	68.1	7e-12	100
		GI:5565692	<i>cumanensis</i>			
		GI:347602329	<i>Crotalus atrox</i>			
			<i>Sistrurus catenatus edwardsi</i>			
1	R.NDEEGWYANLGPMR.L	L-aminoacid oxidase GI:60729671	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>	51.0	9e-09	100
		GI:33355627				
1	R.NDKEGWYANLGPMR.L	L-aminoacid oxidase GI:538259839	<i>Protobothrops flavoviridis</i>	57.9	1e-08	100
		GI:347602324				
		GI:75570145	<i>Bothropoides pauloensis</i>			
		GI:401021343	<i>Gloydus blomhoffii</i>			
2	K.DCGDIVINDLSLIHQPK.E	L-aminoacid oxidase GI:347602324	<i>Lachesis muta</i>	68.1	7e-12	100
		Precursor	<i>Bothropoides pauloensis</i>			
2	K.KNDVLDKDIMLIR.L	L-amino acid oxidase GI:34148047	<i>Bothrops jararaca</i>	52.4	6e-07	100
		Serine protease platelet aggregant				

Identification				BLAST analysis		
Fraction	Peptide	Identified Protein	Taxonomy	Score	E	% sequence
	Sequence			BLAST	Value	
4	K.SAGQLYEESLGK.V	GI:10120751	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	45.2	1e-04	100
		GI:48425312				
		GI:75570145	<i>Agkistrodon halys pallas</i>			
		GI:82088273	<i>Gloydus blomhoffii</i>			
		GI:538260091	<i>Gloydus halys</i>			
		A chain, L-aminoacid oxidase	Ovophis okinavensis			

4	K.SAGQLYQESLGK.A	GI:70797645 GI:284018108 GI:395406796	<i>Daboia russellii</i> <i>siamensis</i> <i>Daboia russellii</i> <i>russellii</i>	44.8	2e <sup>-04</sup>	100
		L-aminoacid oxidase				
8	K.CGENIYMSSIIPIK.W	GI:48428840	<i>Agkistrodon</i> <i>piscivorus</i> <i>piscivorus</i>	55.8	3e <sup>-08</sup>	100
		Piscivorin, cysteine rich protein				
9	R.MWQNDLHPILIER.Y	GI:538259821 GI:380846513 GI:380846523 and 10 more glutaminilcyclase	<i>Protobothrops</i> <i>flavoviridis</i> <i>Cerrophidion</i> <i>godmani</i> <i>Sistrurus</i> <i>catenatus</i> <i>tergeminus</i>	57.9	4e <sup>-09</sup>	100

without ruling out the occurrence of other anticoagulant proteins, identified in this venom. Early studies proposed that even though the *Porthidium* venom has an important assortment of serine proteases, these enzymes were unable to coagulate human plasma or fibrinogen [17], therefore these proteases lack of thrombin-like activities.

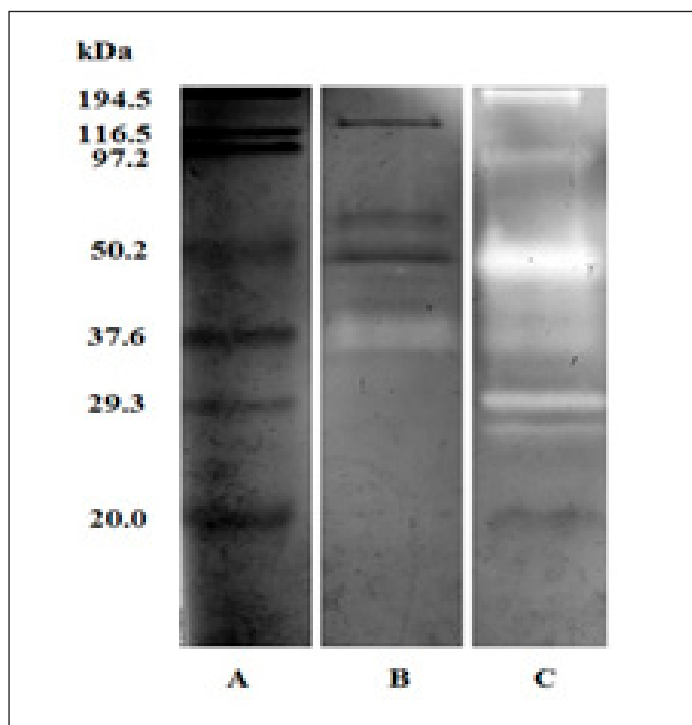
One of the most interesting finding was the detection of venom glutaminil-cyclase (vQC) in the *P.l.h* venom, whose presence had been only before observed in American continent species of *Crotalus atrox*, *C. godmani*, *C. d. terrificus* and *M. fulvius* [60], but not in *Porthidium* genus. Among numerous snake venom constituents, glutaminyl cyclase (vQC) is one of the least understood protein family and none of its members has been purified or characterised until 2014 [50, 60]. Although these proteins were present in the venom in small quantities was observed that had more than 96% sequence similarities among vQCs and approximately 75% sequence identities between vQCs and human secretory QC (hQC) [60]. The vQC glycoprotein of 43 kDa was described from *C. atrox* venom, and its N-terminal sequence was established. Glutaminil-cyclase catalyzes N-terminal pyroglutamate (pGlu) development on proteins or peptides and the discharge of ammonia or water molecules [47]. This change seems to be important for structural stability, resistance to aminopeptidase degradation, and interaction of the proteins or peptides with their associates [48]. The presence of vQC activities in *P.l.h* and several snake venoms can be contemplated as one of the protein families present in the huge spectrum of snake venom proteins that have been already described, but that have been neglected [15]. In human medicine, hQC has been involved on infectious diseases and inflammatory process [19], but its minimal presence and a single form of vQC existing in sample venom put forward its internal management guidance for posttranslational venom proteins adaptation. This finding is in divergence to the characteristics of other toxins in the

venom families, which have experienced enhanced evolution to produce variations with different activities [15]. The present work offers for the first time new evidence about the presence of vQC-like in the venom of *Porthidium genus*.

The *P.l.h* venom showed proteolytic (gelatinolytic and caseinolytic) activities very interesting and with comparable results to several *Bothrops* venoms. This has been widely reported and attributed mainly to the presence of serine and metalloproteases [40,46]. The electrophoretic profile of *P.l.h* venom (6 µg) on polyacrylamide gels copolymerized with gelatine (FIG.5) showed the presence of a degradation band around 37 kDa; while 2 µg of *B. colombiensis* venom (positive control) induced six bands of lysis with the predominance of intensity of ~ 48 kDa band and five weaker bands around 194, 91, 36, 29 and 26 kDa regions. Regarding casein activity, *P. l. hutmanni* venom showed proteolytic activity on casein (107.9 U<sup>cas</sup>). This activity was proportional to the used concentrations (data not shown).

The proteolytic activity value, on a non-specific substrate such as casein (in units of casein = U<sup>cas</sup>)(107.9 U<sup>cas</sup>) obtained for *P.l.h* venom was similar to *B. venezuelensis* (116 U<sup>cas</sup>) [29], *Atropoides picadoi* (103 U<sup>cas</sup>) [1,28], being lower than reported for other Central American lineage species such as *Atropoides nummifer* (217 U<sup>cas</sup>) and *Cerrophidion godmanni* (172 U<sup>cas</sup>) [1,28], while it was higher than reported for other Viperidae such as *Bohtrops asper* (76 U<sup>cas</sup>) and *Lachesis muta* (85 U<sup>cas</sup>); even higher than the found in the *Porthidium ophryromegas* (34 U<sup>cas</sup>) and *Porthidium nasutum* (42 U<sup>cas</sup>) venoms [1,28]. The proteolytic activity value, on another non-specific substrate such as gelatine showed that metalloproteases from Viperidae snakes are regularly linked with extensive haemorrhaging, nonetheless can produce myonecrosis, fibrinogenolysis, and also degrade the extracellular matrix [39]. As it is known, gelatine is a denatured form of collagen and this assay tested proteolytic activity. Proteases

such metalloproteases are the most important enzymes liable for the degradation of the extracellular matrix proteins [3]. The *P.l.h* venom demonstrated gelatinase/proteolytic activity, but much less than the positive control of *B. colombiensis*, the *P.l.h* venom possessed electrophoretic bands with a molecular weight consistent with snake venom type II metalloproteases (FIG.2), suggesting that this toxins was responsible for the heightened gelatinase activity of the venom.



**FIGURE 5. GELATINOLYTIC ACTIVITY OF *P.l.h* VENOM. A) molecular weight marker; B) 6  $\mu$ g *P.l.h* venom; C) 2  $\mu$ g *B. colombiensis* venom**

The phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) were identified varying in their isoelectric point located in the acidic and basic spot locations, displaying similar molecular weight. These secreted PLA<sub>2</sub> proteins are typical of Viperidae family [7]. Most phospholipases A<sub>2</sub> present in snake venoms have comparable amino acid sequence and three-dimensional structure, but wide range of neurotoxic, cardiotoxic and myotoxic activities, as well as anti-coagulant, anti-platelet, haemolytic and cell membrane damage actions, which have been defined [23]. *Bothrops colombiensis* possesses high proportion of phospholipases A<sub>2</sub>. But, *Porthidium* species contain lower amounts of these enzymes, which only inducing slight muscle damage [17,28]. Nevertheless, the presence of PLA<sub>2</sub> even in lower proportions is able to develop anticoagulant properties, acting together with haemostatic proteases, resulting in the inhibition of coagulation complex formation, primarily over hydrolysis of phospholipids-induced inhibition of the intrinsic tenase complex [2]. Likewise, PLA<sub>2</sub> can directly affect platelet membranes: at low concentrations are able to produce aggregation, but, acting at

high concentrations they operate as inhibitors [24].

Among *P.h.l* venom serine proteases, it was identified a platelet aggregant with a 100% identification of a protease from *Bothrops jararaca* [33] possibly involved in thrombosis. Blood coagulation is an exceptionally structured physiological route involving cells i.e. platelets, coagulation cascade proteins, finishing with the factor Xa (FXa)-mediated transformation of the prothrombin zymogen to active thrombin. Until now, although having profuse metalloproteases and serine proteases, *Porthidium* spp. lack of procoagulant activity on human plasma, in contrast to bothropic venoms [17]. The absence of coagulating capacity in *Porthidium* group venom had been early reported, by *Atropoides picadoi* [16], *P. nasutum* and *P. ophryomegas* [16,28], *P. lansbergii lansbergii* [21] and *P. lansbergii hutmanni* [17]. However, the presence of this platelet aggregant fraction could be the first fraction described in this venom that can generate thrombosis. This platelet aggregant could aggregate human platelets, either isolated or in whole blood. In the prothrombinase complex on the platelet surface, FXa cleaves prothrombin at Arg-271, generating the inactive precursor prethrombin-2, which is further attacked at Arg-320-Ile-321 to yield mature thrombin [10, 25]. The present work findings suggest that alternative platelet aggregation by proteases can modify the delicate procoagulant-anticoagulant equilibrium toward thrombosis.

## CONCLUSIONS

*P. lansbergii hutmanni* venom has demonstrated with the previous assays being a venom with high lethal, haemorrhagic, proteolytic and procoagulant activity, whose description will have an enormous utility among the veterinarians and human clinicians, who have to deal with these accidents in its geographical distribution areas. The conformation of previously undefined venoms, and their characteristic components, also will allow the releases of new potentials interesting molecules with therapeutic activity for many diseases treatments. In addition, this will provide new toxins that will allow the improving of the production of better antivenoms for the envenomed victims.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. We would like to thank .We express our sincere gratitude to the Pharmacy Faculty Serpentarium of the Universidad Central de Venezuela.

## Author contributions

Conceived and designed the experiments: MEP and ARA. Performed the experiments: MEP and AMV. Contributed materials/analysis tools: AMV and ARA. Wrote the paper: MEP and ARA. All authors analysed the results and approved the final version of the manuscript.

## Conflict of interest and disclosure

The authors declare that they have not conflict of interest. The authors confirm that there are no financial disclosures for this study

#### BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- [1] ANGULO, Y.; ESCOLANO, J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; SANZ, L.; CALVETE, J.J. Snake venomomics of Central American pitvipers: clues for rationalizing the distinct envenomation profiles of *Atropoides nummifer* and *Atropoides picadoi*. **J. Proteome. Res.** 7:708-719. 2008.
- [2] ATANASOV, V.N.; DANCHEV, D.; MITEWA, M.; PETROVA, S. Hemolytic and anticoagulant study of the neurotoxin vipoxin and its components-basic phospholipase A2 and an acidic inhibitor. **Biochem.** 74: 276–280. 2009.
- [3] BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T.M.; MOURA-DA-SILVA, A.M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: Tissue distribution and *in situ* hydrolysis. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** 4: e727. 2010.
- [4] BREKER, M.; GYMREK, M.; MOLDAVSKI, O.; SCHULDINER, M. Loqate-localization and quantitation atlas of the yeast proteome. A new tool for multiparametric dissection of single-protein behavior in response to biological perturbations in yeast. **Nucleic. Acids. Res.** 42: 726-730. 2014.
- [5] CALVETE, J.J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass. Spectrom.** 42: 1405–1414. 2007.
- [6] CALVETE, J.J. Antivenomics and venom phenotyping: A marriage of convenience to address the performance and range of clinical use of antivenoms. **Toxicon.** 56: 1284–1291. 2010.
- [7] CALVETE, J.J. Venomomics: integrative venom proteomics and beyond. **Biochem. J.** 474: 611-634. 2017.
- [8] CANDIANO, G.; SANTUCCI, L.; PETRETTO, A.; LAVARELLO, C.; INGLESE, E.; BRUSCHI, M.; GHIGGERI, G.M.; BOSCHETTI, E.; RIGHETTI, P.G. Widening and diversifying the proteome capture by combinatorial peptide ligand libraries via Alcian Blue dye binding. **Anal. Chem.** 87:4814-4820. 2015.
- [9] CHERNUSHEVICH, I.V.; LOBODA, A.V.; THOMSON, B.A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. **J. Mass. Spectrom.** 36(8):849-865. 2001.
- [10] DEGUCHI, H.; TAKEYA, H.; GABAZZA, E.C.; NISHIOKA, J.; SUZUKI, K. Prothrombin kringle 1 domain interacts with factor Va during the assembly of prothrombinase complex. **Biochem. J.** 321: 729-735. 1997.
- [11] DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, R.M. Snake venom phospholipase A2 enzymes. In: Mackessy, S.P. (Ed), **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp 173–206. 2010.
- [12] DU, X.Y.; CLEMETSON, K.J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon.** 40: 659-665. 2002.
- [13] ESTRELLA, A.; SÁNCHEZ, E.E.; GALÁN, J.; TAO, W.A.; GUERRERO, B.; NAVARRETE, L.; RODRÍGUEZ-ACOSTA A. Characterization of toxins from the broad-banded water snake *Helicops angulatus* (Linnaeus, 1758): isolation of a cysteine-rich secretory protein, Helicopsin. **Arch. Toxicol.** 85: 305–313. 2011.
- [14] FOX, J.; SERRANO, S. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J. Proteomics.** 72: 200-209. 2009.
- [15] FRY, B.G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J.; RAMJAN, S.F.; VIDAL, N.; POELMANN, R.E.; NORMAN, J.A. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). **Mol. Cell. Proteomics.** 7: 215-246. 2008.
- [16] GENE, J.A.; ROY, A.; ROJAS, G.; GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. Comparative study on the coagulant, desfibrinating, fibrinolytic, and fibrinogenolytic activities of Costa Rican Crotalinae snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon.** 27: 841-848. 1989.
- [17] GIRÓN, M.E.; ESTRELLA, A.; SÁNCHEZ, E.E.; GALÁN, J.; TAO, A.; GUERRERO, B.; SALAZAR, A.M.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Purification and characterization of a metalloproteinase, Porthidin-1, from the venom of Lansberg's hognosed pitvipers (*Porthidium lansbergii hutmanni*). **Toxicon.** 57: 608-618. 2011.
- [18] GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; SUN, M.Z. Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon** 60: 302-311. 2012.
- [19] HELLVARD, A.; MARESZ, K.; SCHILLING, S.; GRAUBNER, S.; HEISER, U.; JONSSON, R.; CYNIS, H.; DEMUTH, H.U.; POTEPA, J.; MYDEL, P. Glutamyl Cyclases as novel targets for the treatment of septic arthritis. **J. Infect. Dis.** 207: 768–777. 2013.
- [20] IZIDORO, L.F.; SOBRINHO, J.C.; MENDES, M.M.; COSTA, T.R.; GRABNER, A.N.; RODRIGUES, V.M.; DA SILVA, S.L.; ZANCHI, B.; ZULIANI, J.P.; FERNANDES, C.F.; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A.M. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed. Res. Int.** 2014: 196754. 2014.



- [21] JIMÉNEZ-CHARRIS, E.; MONTEALEGRE-SANCHEZ, L.; SOLANO-REDONDO, L.; CAMACHO, E.; CASTRO-HERRERA, F.; FIERRO-PÉREZ, L.; LOMONTE, B. Proteomic and functional analyses of the venom of *Porthidium lansbergii lansbergii* (*Lansberg's hognose viper*) from the Atlantic Department of Colombia. **J. Proteom.** 114: 287-299. 2015.
- [22] KAMIGUTI, A.S.; ZUZEL, M.; THEAKSTON, R.D.G. Snake venom metalloproteinases and disintegrins: Interactions with cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31:853-862. 1998.
- [23] KINI, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon.** 42: 827-840. 2003.
- [24] KINI, R.M. Anticoagulant proteins from snake venoms: Structure, function and mechanism. **Biochem. J.** 397: 377-387. 2006.
- [25] KOMAROV, A.; PANCHENKO, E.; DOBROVOLSKY, A.; KARPOV, Y.; DEEV, A.; TITAEVA, E.; DAVLETOV, K.; ES-HKEEVA, A.; MARKOVA, L. D-dimer and platelet aggregability are related to thrombotic events in patients with peripheral arterial occlusive disease. **Eur. Heart. J.** 23:1309-1316. 2002.
- [26] LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assemble of the head bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685. 1970.
- [27] LEMOINE, K.; GIRÓN, M.E.; AGUILAR, I.; NAVARRETE, L.F.; RODRIGUEZ-ACOSTA, A. Proteolytic, hemorrhagic, and neurotoxic activities caused by *Leptodeira annulata ashmeadii* (Serpentes:Colubridae) Duvernoy's gland secretion. **Wildern. Environm. Med.** 15: 82-89. 2004;
- [28] LOMONTE, B.; REY-SUÁREZ, P.; TSAIA, W.; ANGULO, Y.; SASA, A.M.; GUTIÉRREZ, J.M.; CALVETE, J.J. Snake venomomics of the pit vipers *Porthidium nasutum*, *Porthidium ophryomegas*, and *Cerrophidion godmani* from Costa Rica: Toxicological and taxonomical insights. **J. Proteomics.** 75: 1675-1689. 2012.
- [29] LÓPEZ, J.C.; VARGAS, A.M.; SCANNONE, H.; FERNANDEZ, Y. Chromatographic, electrophoretic and enzymatic study of the whole venom and fraction I of the Venezuelan snake *Bothrops venezuelensis* (Tigra mariposa). **Rev. Cientif. FVC-LUZ.** IX (4): 314-320. 1999.
- [30] LOWRY, O.; ROSENBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 93:265-275. 1951.
- [31] MACKESSY, S.P. Fractionation of red diamond rattlesnake (*Crotalus ruber ruber*) venom: protease, phosphodiesterase, L-amino acid oxidase activities and effects of metal ions and inhibitors on protease activity. **Toxicon.** 23: 337-340. 1985.
- [32] MARGRES, M.J.; MCGIVERN, J.J.; WRAY, K.P.; SEAVY, M.; CALVIN, K.; ROKYTA, D.R. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **J. Proteomics.** 96: 145-148. 2014.
- [33] MATSUI, T.; HAMAKO, J.; TITANI, K. Structure and function of snake venom proteins affecting platelet plug formation. **Toxins (Basel).** 2: 10-23. 2010.
- [34] MORRISSETTE, J.; KRÄTZSCHMAR, J.; HAENDLER, B.; EL-HAYEK, R.; MOCHCA-MORALES, J.; MARTIN, B.M.; PATEL, J.R.; MOSS, R.L.; SCHLEUNING, W.D.; CORONADO, R. Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors. **Bio-phys .J.** 68: 2280-2288. 1995.
- [35] MOTULSKY, H. J. GraphPad Statistics Guide. In linea:<http://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm>. 5/07/2017.
- [36] MOURA-DA-SILVA, A.M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: Effects on platelets, inflammatory and endothelial cells. **Curr. Pharm. Des.** 13: 2893-2905. 2007.
- [37] NATHAN, I.; DVILANSKY, A.; YIRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Thromb. Haemost.** 48: 277-282. 1982.
- [38] NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH). Principles of laboratory animal care. Maryland, National Institute of Health of United States, Publication Series 85-23. Pp1-126. 1985.
- [39] OLIVEIRA, A.K.; PAES-LEME, A.F.; ASEGA, A.F.; CAMARGO, A.C.; FOX, J.W.; SERRANO, S.M. New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. **Thromb. Haemost.** 104: 485-497. 2010.
- [40] ORTIZ, C.; LAZO, F.; BELLIDO, C.; GONZALES, E.; YARLEQUÉ, A. Variaciones en las actividades enzimáticas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* "jergón", de tres zonas geográficas del Perú. **Rev. Peru. Med. Exp. Sal .Pub.** 29: 198-205. 2012.
- [41] PHILLIPS, D.J.; SWENSON, S.D.; MARKLAND, F.S. JR.

- Thrombin-like snake venom serine proteinases. In: Mac-kessy, S.P. (Ed). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. Pp. 139–154. 2010.
- [42] PIFANO, F. Investigacion y docencia en Medicina Tropical. **Arch. Ven. Med. Trop. Parasitol.** 4: 1-203. 1961.
- [43] PINEDA, M.E.; GIRÓN, M.E.; ESTRELLA, A.; SÁNCHEZ, E.; AGUILAR, I.; FERNÁNDEZ, I.; VARGAS, A.M.; SCAN-NONE, H.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A. Inhibition of the hemorrhagic and proteolytic activities of Lansberg's Hog-nose Pit Viper (*Porthidium lansbergii hutmanni*) venom by opossum (*Didelphis marsupialis*) Serum: Isolation of *Didelphis marsupialis* 0.15Dm Fraction on DEAE-Cellulose Chromatography. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 30: 883–896. 2008.
- [44] RAMAZANOVA, A.S.; STARKOV, V.G.; OSIPOV, A.V.; ZI-GANSHIN, R.H.; FILKIN, S.Y.; TSETLIN, V.I.; UTKIN, Y.N. Cysteine-rich venom proteins from the snakes of Viperinae subfamily-Molecular cloning and phylogenetic relationship. **Toxicon.** 53: 162–168. 2009.
- [45] SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon.** 57: 627–645. 2011.
- [46] SALAZAR, A.M.; RODRÍGUEZ-ACOSTA, A.; GIRÓN, M.E.; AGUILAR, I.; GUERRERO, B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (*Bothrops atrox*) from different geographical areas in Venezuela. **Thromb. Res.** 120: 95-104. 2007.
- [47] SEIFERT, F.; SCHULZ, K.; KOCH, B.; MANHART, S.; DEMUTH, H.U.; SCHILLING, S. Glutamyl cyclases display significant catalytic proficiency for glutamyl substrates. **Biochem.** 48: 11831–11833. 2009.
- [48] SERRANO, S.M.T.; SHANNON, J.D.; WANG, D.; CAMAR-GO, A.C.M.; FOX, J.W. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis: An approach to understanding venom proteomics. **Pro-teomics.** 5: 501–510. 2005.
- [49] SPEARMAN- KÄRBER, R. Alternative methods of analysis for quantal responses. In: Finney, D (Ed). **Statistical method in biological assay**. London: Charles Griffin. Pp 1– 78. 1978.
- [50] STEPHAN, A.; WERMANN, M.; VON BOHLEN, A.; KOCH, B.; CYNIS, H.; DEMUTH, H.U.; SCHILLING, S. Mammalian glutamyl cyclases and their isoenzymes have identical enzymatic characteristics. **FEBS. J.** 276: 6522–6536. 2009.
- [51] STILES, B.G.; SEXTON, F.W.; WEINSTEIN, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon.** 29:1129-1141. 1991.
- [52] TAN, C.H.; TAN, K.Y.; FUNG, SY.; TAN, N.H. Venom-gland transcriptome and venomproteome of the Malaysian king cobra (*Ophiophagus hannah*) **BMC. Genom.** 16: 1–21. 2015.
- [53] TERRA, R.M.; PINTO, A.F.; GUIMARÃES, J.A.; FOX, J.W. Proteomic profiling of snake venom metalloproteinases (SVMPs): insights into venom induced pathology. **Toxicon.** 54: 836-844. 2009.
- [54] TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.** 272: 9539–9542. 1997.
- [55] VEJAYAN, J.; SHIN-YEE, L.; PONNUDURAI, G.; AMBU, S.; IBRAHIM, I. Protein profile analysis of Malaysian snake venoms by two-dimensional gel electrophoresis. **J. Ven-om. Anim. Toxins. Incl.Trop. Dis.** 16: 623–630. 2010.
- [56] VEJAYAN, J.; TANG, M.S.; HALIJAH, I. The role of conventional two-dimensional electrophoresis (2DE) and its newer applications in the study of snake venoms. In: Heazlewood, J.L.; Petzold, C.J. (Eds.). **Proteomic Applications in Biol-ogy**. In Tech, Rijeka, Croatia. Pp 226–252. 2012.
- [57] YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Structure and function of snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Toxicon.** 44: 227–231. 2004
- [58] YAMAZAKI, Y.; KOIKE, H.; SUGIYAMA, Y.; MOTOYOSHI, K.; WADA, T.; HISHINUMA, S.; MITA, M.; MORITA, T. Cloning and characterization of novel snake venom proteins that block smooth muscle contraction. **Eur. J. Bio-chem.** 269: 2708-2715. 2002.
- [59] YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. **Curr. Pharm. Des.** 13: 2872-2886. 2007.
- [60] YING-MING, W.; KAI-FA, H.; INN-HO, T. Snake venom glutamyl cyclases: Purification, cloning, kinetic study, recombinant expression, and comparison with the human enzyme. **Toxicon.** 86: 40-50. 2014.

# PARÁMETROS POBLACIONALES DEL CANGREJO *Callinectes danae* (DECAPODA: PORTUNIDAE) DE LA ISLETA, ISLA DE MARGARITA, VENEZUELA

Population Parameters Of The Crab *Callinectes danae* (Decapoda: Portunidae)  
From La Isleta, Margarita Island, Venezuela

Nora Eslava<sup>1</sup>, Leo Walter González<sup>1</sup>, Francisco Guevara<sup>1</sup> y Idar Quijada<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Área de Biología y Recursos Pesqueros, Instituto de Investigaciones Científicas, <sup>2</sup>Escuela de Ciencias Aplicadas del Mar. Universidad de Oriente Boca del Río, isla de Margarita, estado Nueva Esparta, Venezuela.  
Correo-E: neslava20@yahoo.es. Teléfono +58 414-789.8898

## RESUMEN

La pesquería del cangrejo *Callinectes danae* en la isla de Margarita, Venezuela, está restringida en zonas cercanas a lagunas costeras y está considerada como pesca alternativa económicamente rentable. La presente investigación tuvo como objetivos determinar el crecimiento y mortalidad del cangrejo *C. danae* con la finalidad de aportar información básica de la dinámica de la pesquería en su fase de desarrollo. Se realizaron muestreos mensuales de enero a diciembre 2014, para un total de 3.624 ejemplares recolectados en el puerto pesquero La Isleta, isla de Margarita. A cada ejemplar se le tomó datos del ancho del caparazón (LC), peso total (PT) y se determinó el sexo. Se comprobó que existe diferencia sexual con respecto a la longitud ( $t_s = 36,62$  P<0,05); por lo que se estableció la relación longitud-peso por separado: PT =  $3,46 e^{-4} * L^{2,684}$  machos, PT =  $3,52 e^{-4} * L^{2,677}$  hembras, demostrando con la prueba de b un crecimiento isométrico en ambos sexos (machos:  $t_s = -1,480$  P>0,05; hembras:  $t_s = -1,203$  P>0,05). La composición global por sexos fue 44% machos y 56% hembras, siendo la proporción de 1:1,27 ( $\chi^2 = 50,31$  P<0,05). La estimación del crecimiento se basó en el análisis de la distribución de frecuencia de longitudes, utilizando las rutinas del software FiSAT. Los parámetros estimados del modelo de von Bertalanffy fueron, machos: LC<sub>∞</sub> = 131 mm, PT<sub>∞</sub> = 166,66 g, k = 0,77 a<sup>-1</sup>, t<sub>0</sub> = -0,139 años (a) y hembras: LC<sub>∞</sub> = 130 mm, PT<sub>∞</sub> = 159,84 g, k = 0,94 a<sup>-1</sup>, t<sub>0</sub> = -0,113 (a), con una edad máxima de 4 a en machos y 3 a en hembras, lo que indica que *C. danae* es una especie de vida corta, con un coeficiente de crecimiento rápido. El índice de desempeño del crecimiento (Ø') fue de 4,12 en machos y 4,20 en hembras. Los valores de las mortalidades: natural (M = 1,19 a<sup>-1</sup> machos y M = 1,77 a<sup>-1</sup> hembras), por pesca (F = 3,52 a<sup>-1</sup> machos y F = 5,80 a<sup>-1</sup> hembras) y total (Z = 4,71 a<sup>-1</sup> machos y Z = 7,57 a<sup>-1</sup> hembras), sugieren reducir la tasa de mortalidad por pesca y proteger las hembras, estableciendo refugios en la boca y dentro de la laguna de Las Marites durante el periodo de máxima actividad reproductiva.

**Palabra clave:** Crecimiento; mortalidad; *Callinectes danae*; Venezuela

## ABSTRACT

The *Callinectes danae* crab fishery on Margarita Island, Venezuela, is restricted in areas close to coastal lagoons and is considered to be economically profitable alternative fishery. The objectives of the present investigation were to determine the growth and mortality of the crab *C. danae*, to provide basic information on the dynamics of a fishery in its development phase. Monthly samples were taken from January to December 2014, for a total of 3,624 specimens collected at the fishing port of La Isleta, Margarita Island. The following data were determined for each specimen: carapace width (CL), total weight (TW) and sex. It was verified that there is sexual difference with respect to the length ( $t_s = 36.62$  P<0.05); so the length-weight ratio was established separately: TW =  $3.46 e^{-4} * L^{2.684}$  males, TW =  $3.52 e^{-4} * L^{2.677}$  females, showing isometric growth (b test) in both sexes (males:  $t_s = -1.480$  P>0.05, females:  $t_s = -1.203$  P>0.05). Sex ratio was 44% males and 56% females, with a 1:1.27 sexual proportion ( $\chi^2 = 50.31$  P<0.05). The growth estimate was based on the analysis of the frequency distribution of lengths, using the routines of FiSAT software. The estimated parameters of the von Bertalanffy model were, males: CL<sub>∞</sub> = 130.90 mm, TW<sub>∞</sub> = 166.66 g, k = 0.77 yr<sup>-1</sup>, t<sub>0</sub> = -0.139 years (yrs) and females: CL<sub>∞</sub> = 129.79 mm, TW<sub>∞</sub> = 159.84 g, k = 0.94 yr<sup>-1</sup>, t<sub>0</sub> = -0.113 yrs, with a maximum age of 4 yrs in males and 3 yrs in females, indicating that *C. danae* is a short-lived species with a rapid growth coefficient. The growth performance index (Ø') was 4.12 for males and 4.20 for females. The values of mortalities: natural (M = 1.19 yr<sup>-1</sup> males and M = 1.77 yr<sup>-1</sup> females), by fishing (F = 3.52 yr<sup>-1</sup> males and F = 5.80 yr<sup>-1</sup> females) and total (Z = 4.71 yr<sup>-1</sup> males and Z = 7.57 yr<sup>-1</sup> females), suggest to reduce the fishing mortality rate and to protect the females, establishing shelters in the mouth and inside the lagoon of Las Marites during the period of maximum reproductive activity.

**Key words:** Growth; mortality; *Callinectes danae*; Venezuela

## INTRODUCCIÓN

Las especies de *Callinectes*, conocidas comúnmente como jaibas, representan un recurso pesquero comercial importante en aguas del Atlántico y Pacífico occidental, alcanzando elevados valores en los mercados de consumo. La pesca del cangrejo *Callinectes danae* en Venezuela está restringida en zonas cercanas a lagunas costeras, pero los volúmenes de captura se desconocen. En la isla de Margarita, algunos pescadores de la comunidad de La Isleta se dedican a la pesca del cangrejo durante todo el año y otros de manera eventual, comercializando el recurso a intermediarios quienes lo venden a restaurantes, autos mercados y pequeños comerciantes de los mercados locales, para finalmente llegar al consumidor [14].

En la dinámica de poblaciones de crustáceos sometidos a explotación, el conocimiento y caracterización del crecimiento individual es de suma importancia, porque este proceso junto con la mortalidad, supervivencia y reclutamiento, permiten estimaciones más precisas sobre el tamaño de la población y la disponibilidad del recurso [5, 10]. El crecimiento de los crustáceos es un proceso discontinuo porque el caparazón es limitante hasta cuando ocurre la muda o ecdisis, que implica el abandono y degradación del viejo exoesqueleto y síntesis de nuevos tejidos que conlleva a un incremento de talla, peso y forma casi instantáneos. Por otro lado, los crustáceos carecen de estructuras calcificadas permanentes que permitan identificar marcas que indiquen el aumento de la talla como ocurre con otros grupos de animales: conchillas o valvas de moluscos o escamas, huesos y otolitos de peces, ante esta situación el método de distribución del ancho del caparazón es el más accesible para estimar su crecimiento [6, 26].

El estudio del crecimiento en los crustáceos permite determinar el tamaño corporal en función de la edad o tiempo de vida del organismo, mediante el uso de métodos que ayudan a convertir las frecuencias de tallas en composición por edades. Aunque la fisiología de los crustáceos es muy diferente a la de los peces, el crecimiento, en la mayoría, se adecua al modelo de crecimiento de von Bertalanffy [38].

Se han realizado investigaciones sobre crecimiento del cangrejo *C. danae* [8, 10, 19], biología poblacional, reproducción, distribución espacial relacionada con la salinidad, temperatura, oxígeno disuelto y pH, y reclutamiento de juveniles vinculado con la intensidad estacional reproductiva [3, 7, 9].

Indudablemente, *C. danae* es un recurso de considerable importancia económica entre los crustáceos comestibles; sobre todo en la isla de Margarita, y es una actividad alternativa de la captura de peces. En el 2012 se determinó su alta rentabilidad económica, constituyendo las unidades pesqueras (embarcación, motor fuera de borda y nasas) microempresas empleadoras de mano de obra administradas directamente por el propietario, las cuales podrían contribuir al crecimiento económico de las comunidades costeras [14]. Por tal razón, se decidió como

objetivo estimar el crecimiento y la mortalidad con la finalidad de proporcionar información biológica básica de algunos aspectos de la dinámica poblacional para su ordenación con criterio precautorio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo

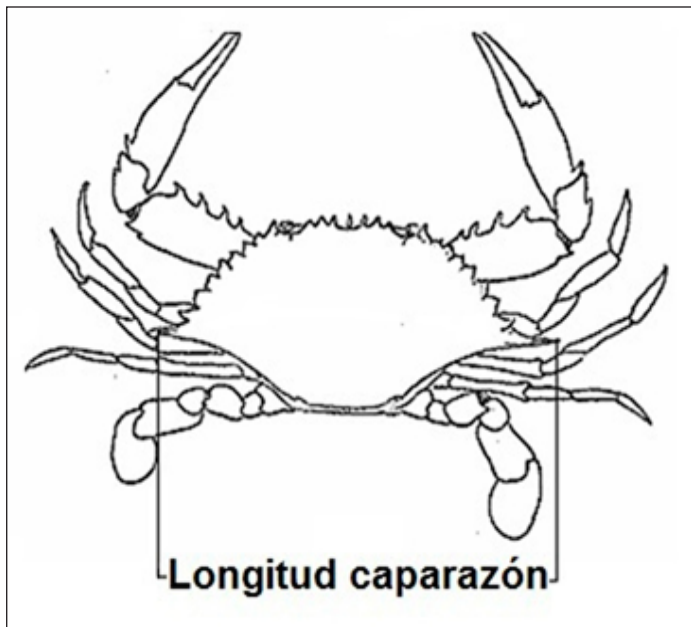
Los muestreos se realizaron en áreas cercanas a la laguna de Las Marites (FIG. 1), ubicada en la costa sur oriental de la isla de Margarita con un área de 24 kilómetros (km<sup>2</sup>), profundidad máxima de 4 metros (m), agua hipersalina de 38,25 unidades prácticas de salinidad (ups) promedio, temperatura de 27,8 a 29,1 °C, oxígeno disuelto de 3,99 a 4,02 mililitros (mL) y de 2,4 a 2,9 miligramos (mg) de clorofila [20]. El arte de pesca utilizado fueron trampas conocidas como “nasas cangrejeras”, las cuales presentan una forma rectangular de 50 centímetros (cm) de largo, 40 cm de ancho y de 35 a 40 cm de altura con apertura de malla de 2 × 2 cm. Esta nasa posee 3 bocas, 1 compartimiento para la carnada y 2 para la extracción del cangrejo [14].



**FIGURA 1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE PESCA DE *Callinectes danae* DE LA ISLETA, ISLA DE MARGARITA, VENEZUELA**

A cada uno de los ejemplares colectados se le determinó el ancho del caparazón (LC), definido como la distancia comprendida entre las dos espinas agudas laterales (FIG. 2), para esto se dispuso de un vernier, con una apreciación de 0,5 milímetros (mm). Al mismo tiempo se determinó el peso total (PT) mediante una balanza digital marca Digiwesigh, con capacidad de 3 kilogramos (kg) y apreciación de 0,01 gramos (g). Se consideraron solo los especímenes intactos, organismos con ausencia de apéndices o de espinas laterales no fueron tomados

en cuenta. Para la identificación de la especie y sexo se utilizaron claves [16, 30], considerándose machos aquellos ejemplares que presentaron el abdomen estrecho en forma de "T" invertida, y hembras los que tenían el abdomen en forma de "U" invertida.



**FIGURA 2 .MEDIDA DE LONGITUD DEL CAPARAZÓN DE *Callinectes danae***

#### Condiciones meteorológicas

El régimen de lluvias dominado por los frentes fríos, unidos a la evaporación, son los principales modificadores de la salinidad en la laguna Las Marites, que alcanzaron en el periodo 1966–2012 una precipitación acumulada mensual de enero a junio de 16 mm (estación seca) y de julio a diciembre de 44 mm (estación lluviosa) [20].

#### Análisis de datos

Se comprobó la diferencia significativa entre las longitudes por sexo mediante la *t-student* ( $t_{s\ tab} = 1,96$ ) y se determinó la proporción sexual aplicando el *Ji-cuadrado* ( $\chi^2_{\ tab} = 3,84$ ) con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$  en las dos pruebas estadísticas, respectivamente [41].

#### Relación longitud-peso

Se determinó en machos y hembras según la ecuación potencial de Ricker [32]:  $PT = a * LC^b$ ; donde PT es el peso total del organismo, LC es el ancho del caparazón (mm), a es la intersección con el eje de la ordenada y b es la pendiente de la curva. Las constantes a y b fueron estimadas por regresión lineal de Modelo II entre las variables transformadas a logaritmos. Se probó la hipótesis del crecimiento isométrico mediante una prueba *t-student* ( $t_{s\ tab} = 1,96$ ) con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ , los resultados de esta prueba fueron usados para determinar el tipo

de crecimiento: isométrico ( $b = 3$ ) o alométrico ( $b \neq 3$ ).

#### Parámetros de crecimiento y mortalidad

La estimación del crecimiento se basó en las distribuciones mensuales de frecuencia de longitudes, de machos y hembras por separado, con un rango de 1 mm, para ello se usó el software FiSAT [12]. En primer lugar, se determinó una longitud asintótica ( $LC_{\infty}$ ) preliminar, que permitió estimar el coeficiente de crecimiento (k) a través de la rutina ELEFAN I mediante la superficie de respuesta [28, 39]. Con esta rutina se obtuvo una nueva  $LC_{\infty}$  con su respectivo k, seleccionando el par de valores con la más alta bondad de ajuste (Rn). Luego, se calculó  $t_0$  mediante la ecuación:  $\log_{10}(-t_0) = -0,3922 - 0,2752 * \log_{10}LC_{\infty} - 1,038 * \log_{10}k$ , donde  $t_0$  es la edad hipotética a la cual la longitud del caparazón es cero,  $LC_{\infty}$  es la longitud asintótica promedio máxima del caparazón y k, es la constante de crecimiento o coeficiente de curvatura [22]. Para determinar la edad límite o longevidad se utilizó la expresión:  $A_{0,95} = t_0 + 2,996/k$ , donde  $A_{0,95}$  es la edad límite teórica o tiempo máximo requerido para que alcance el 95% de su longitud máxima del caparazón ( $LC_{\infty}$ ) [35]. El peso asintótico se determinó mediante el modelo:  $PT_{\infty} = a * LC_{\infty}^b$ , donde  $PT_{\infty}$  es el peso total asintótico o peso máximo [11].

Una vez calculados los parámetros  $LC_{\infty}$ ,  $PT_{\infty}$ , k y  $t_0$ , se procedió a establecer las curvas de crecimiento en longitud y peso del modelo de von Bertalanffy [38]:  $LC_t = LC_{\infty} [1 - e^{-k(t-t_0)}]$ ;  $PT_t = PT_{\infty} [1 - e^{-k(t-t_0)}]^b$ . El índice de desempeño del crecimiento Phi prima ( $\Phi'$ ) se estimó a través de la fórmula:  $\Phi' = \log_{10}k + 2 \log_{10}LC_{\infty}$  [24] y se utilizó como el mejor medio disponible para comparar los parámetros de crecimiento de *C. danae* obtenidos en el presente estudio, con los determinados por otros autores, considerando que el coeficiente de variación (CV%) no debe exceder del 4% para asumir que los resultados son estadísticamente similares [34].

Con los valores de  $LC_{50}$  en machos (83,6 mm) y hembras (70,5 mm) [29], se estimó la edad del 50% de la población madura ( $t_{50}$ ) a través de la ecuación de crecimiento inversa del modelo de von Bertalanffy:  $t_{50} = t_0 - 1/k * \ln(1 - LC_{50}/LC_{\infty})$  a fin de determinar la mortalidad natural (M) según el método de Rikhter y Efanov [33]:  $M = 1,521/(t_{50}^{0,72}) - 0,155$  por año. La mortalidad total (Z) se calculó utilizando el método de la curva de captura linealizada:  $\ln C(LC_1, LC_2)/\Delta t(LC_1, LC_2) = c - Z * t(LC_1 + LC_2/2)$  [23]. La mortalidad por pesca (F) se determinó aplicando la ecuación:  $F = Z - M$  [34].

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron 3.624 ejemplares del cangrejo *C. danae*, colectados mensualmente durante el período enero-diciembre del 2014, obteniendo un mínimo de 47 y un máximo de 725 individuos, de los cuales 1.598 (44%) fueron machos y 2.026 (56%) hembras. Los machos presentaron un intervalo de longitudes entre 49 y 132 mm, con una media de 91,7 mm ( $DE \pm 10,6$ ) y pesos que oscilaron entre 12 y 162 g, con una media

**TABLA I**  
**EJEMPLARES EXAMINADOS DE *Callinectes danae* DE LA ISLA DE MARGARITA,**  
**ENTRE ENERO Y DICIEMBRE 2014**

Meses	Machos											Hembras								
	Longitud caparazón (mm)					Peso total (g)					Longitud caparazón (mm)					Peso total (g)				
	n	Min- Max	X	DE±		Min- Max	X	DE±		n	Min- Max	X	DE±		Min- Max	X	DE±			
Ene.	39	67-111	91,44	8,60	24-107	64,21	16,91		75	45-91	75,87	7,86		17-68	38,00	9,59				
Feb.	24	55-112	89,92	13,07	16-131	68,40	27,17		23	62-94	75,70	8,73		24-68	40,57	15,79				
Mar.	56	55-132	86,82	13,34	18-138	61,96	23,26		50	64-130	78,24	11,56		23-153	43,52	23,43				
Abr.	114	49-111	84,10	11,28	12-102	49,89	17,97		58	54-111	75,31	13,04		13-133	41,17	30,12				
May.	156	60-114	91,24	9,92	20-117	62,34	19,12		63	57-100	76,56	10,20		13-89	39,40	16,37				
Jun.	146	66-116	95,01	95,01	26-126	71,82	18,83		125	61-109	78,62	7,85		17-78	40,51	10,87				
Jul.	290	53-114	91,94	10,23	13-116	67,12	19,09		201	53-109	79,56	8,31		12-108	43,96	13,05				
Ago.	324	57-115	93,31	9,32	17-126	71,62	19,18		401	56-130	79,24	7,41		14-142	43,90	11,69				
Sep.	200	73-125	94,52	9,88	12-162	74,19	23,31		354	62-104	79,86	5,63		22-91	45,48	9,70				
Oct.	82	68-115	92,85	11,15	26-119	73,94	23,17		255	61-98	79,19	5,94		23-37	45,34	9,13				
Nov.	78	61-111	89,33	10,11	17-115	66,08	20,63		277	56-102	77,90	6,22		15-90	42,07	10,20				
Dic.	89	51-119	89,00	11,12	15-140	59,22	23,36		144	45-93	75,29	5,86		15-81	37,40	11,61				
<b>Total</b>	<b>1.598</b>		<b>91,7</b>	<b>10,6</b>		<b>67,27</b>	<b>21,34</b>		<b>2.026</b>		<b>78,5</b>	<b>7,4</b>			<b>42,95</b>	<b>12,68</b>				

n = número de ejemplares examinados; Min = valor mínimo; Max = valor máximo; X = media; DE = desviación estándar

**TABLA II**  
**PROPORCIÓN SEXUAL MENSUAL DE *Callinectes danae*, ENTRE ENERO Y DICIEMBRE 2014**

Meses	♂♂	♀♀	%♂♂	%♀♀	Total	$\chi^2$	Significancia
Enero	39	75	34	66	114	10,75	P<0,05
Febrero	24	23	51	49	47	0,09	P>0,05
Marzo	56	50	53	47	106	0,46	P>0,05
Abril	114	58	66	34	172	18,89	P<0,05
Mayo	156	63	71	29	219	40,35	P<0,05
Junio	146	125	54	46	271	1,79	P>0,05
Julio	290	201	59	41	491	16,50	P<0,05
Agosto	324	401	45	55	725	7,97	P<0,05
Septiembre	200	354	36	64	554	42,25	P<0,05
Octubre	82	255	24	76	337	87,79	P<0,05
Noviembre	78	277	22	78	355	110,43	P<0,05
Diciembre	89	144	38	62	233	12,52	P<0,05
<b>Total</b>	<b>1.598</b>	<b>2.026</b>	<b>44</b>	<b>56</b>	<b>3.624</b>	<b>50,31</b>	<b>P&lt;0,05</b>

de 67,27 g (DE $\pm$  21,34). Por otro lado, las hembras presentaron un intervalo de longitudes entre 45 a 130 mm, con una media de 78,5 mm (DE $\pm$ 7,4) y pesos que oscilaron entre 12 a 153 g, con una media de 42,95 g (DE $\pm$  12,68). Los machos alcanzaron mayores longitudes y pesos que las hembras (TABLA I), este dimorfismo sexual puede ser explicado por la diferencia en el tamaño de los apéndices quelados, los que además facilitan su dominio sobre las hembras durante la cópula, siendo una particularidad en cangrejos braquiuros [4].

La proporción global por sexo fue de 1:1,27 ( $\chi^2 = 50,31$  P<0,05) (TABLA II), la cual podría estar relacionada con el proceso de reproducción continua durante todo el año (a) y con la fecundidad [9]. La zona de pesca está muy cercana a la laguna de Las Marites, lo que hace suponer que las hembras migran a aguas de mayor salinidad luego de la fecundación, mientras que los machos permanecen en aguas cercanas o dentro de la laguna. Algo similar ocurre con *C. sapidus* que realiza la cópula en aguas de baja salinidad y luego las hembras fecundadas migran hacia aguas de mayor salinidad, mientras los machos permanecen dentro de su ambiente local copulando con otras hembras [36].

Los valores de precipitación de la Estación Meteorológica de Porlamar, isla de Margarita en 2014, indicaron una precipitación acumulada de 1,71 mm en la época seca y 65,28 mm en la época lluviosa. En la zona de pesca, los ejemplares de machos y hembras inmaduros fueron más abundantes en la época seca, mientras que los maduros y hembras ovígeras en la época lluviosa. Los juveniles y hembras ovígeras migran a lugares de mayor salinidad y profundidad porque les asegura el alimento y crecimiento a las larvas, además de servirles de refugio para protegerse de los depredadores. Se sugiere que la lluvia es

una variable determinante en la distribución y en la abundancia espacio-temporal de *C. danae* que responde a una migración ontogénica.

#### Distribución de tallas

*Callinectes danae* ingresa a la zona de pesca a partir de una longitud de 45 mm, hallándose en mayor cantidad los machos de 90 mm y las hembras de 80 mm (FIG. 3). El análisis de frecuencia de longitudes confirma un reclutamiento diferencial de acuerdo al sexo, los machos se reclutaron en abril a una longitud de 49 mm; mientras que las hembras entraron a partir de 45 mm en enero y diciembre. El reclutamiento de juveniles pudo ser el resultado de la intensidad estacional en la reproducción de *C. danae* y a la selectividad de la nasa, debido a que estas controlan la retención y la fuga de los especímenes de acuerdo a su tamaño [27].

#### Relación longitud-peso

Las longitudes medias de machos y hembras presentaron diferencias significativas con respecto a la longitud del caparazón ( $t_s = 40,6$ ; P<0,05); razón por la cual la expresión se estableció por separado, quedando en los machos:  $PT = 3,46 e^{-4} * LC^{2,684}$  y en las hembras:  $PT = 3,52 e^{-4} * LC^{2,677}$  (FIG. 4), demostrando crecimiento isométrico tanto en machos ( $t_s = -1,480$  P>0,05) como en hembras ( $t_s = -1,203$  P>0,05) [25]. Este resultado concuerda con el tipo de crecimiento de *C. danae* del Balneário Shangrilá, Brasil [7] y con *C. arcuatus*, *C. bellicosus* y *C. toxotes* del sistema lagunar Mar Muerto, Oaxaca-Chiapas, México [13]. El género *Callinectes* tiende a tener un crecimiento isométrico que, eventualmente puede mostrar crecimiento alométrico, debido a la presencia de hembras en la temporada reproductiva [17, 21].

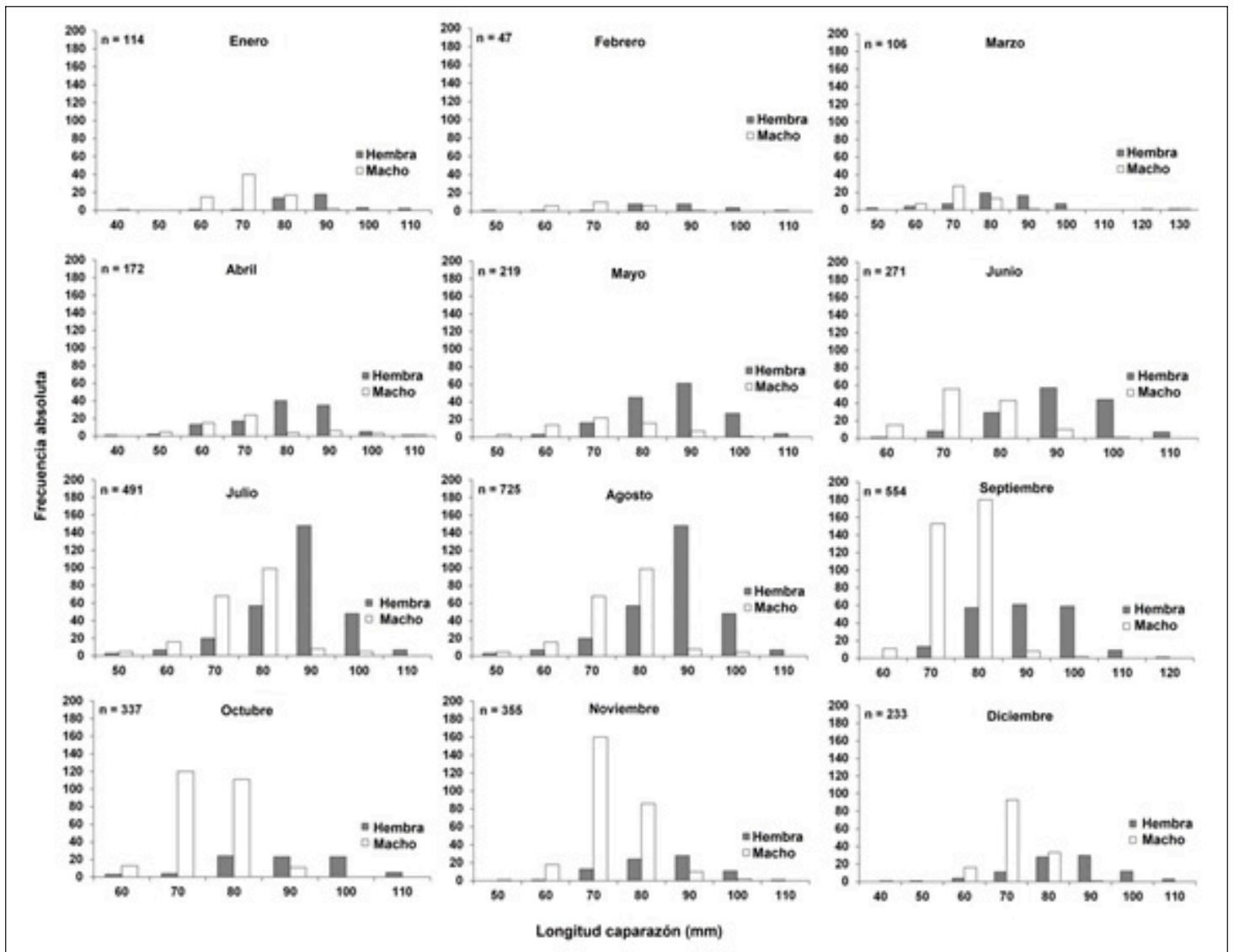


FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN MENSUAL DE FRECUENCIA DE LONGITUDES DE MACHOS Y HEMBRAS DE *Callinectes danae*

Sin embargo, otros investigadores determinaron para *C. danae* un tipo de crecimiento alométrico [4, 10], posiblemente, pudiera deberse a la influencia de las variables hidrológicas sobre la población, considerando que el coeficiente de crecimiento depende de las características ontogenéticas [25].

### Crecimiento

Los parámetros de crecimiento obtenidos fueron: machos ( $LC_{\infty} = 131$  mm,  $k = 0,77$   $a^{-1}$  ( $R_n = 0,116$ ),  $t_0 = -0,139$  a) y hembras ( $LC_{\infty} = 130$  mm,  $k = 0,94$   $a^{-1}$  ( $R_n = 0,109$ ),  $t_0 = -0,113$  a), presentando las hembras un crecimiento más rápido que los machos y una expectativa de vida de 4 a en machos y 3 a en hembras. Sin embargo, estos valores difieren con los obtenidos por otros investigadores [8, 10, 19, 40]. Los parámetros de crecimiento divergen de una especie a otra, y pueden variar de una población a otra durante su ciclo de vida. En consecuencia, cohortes

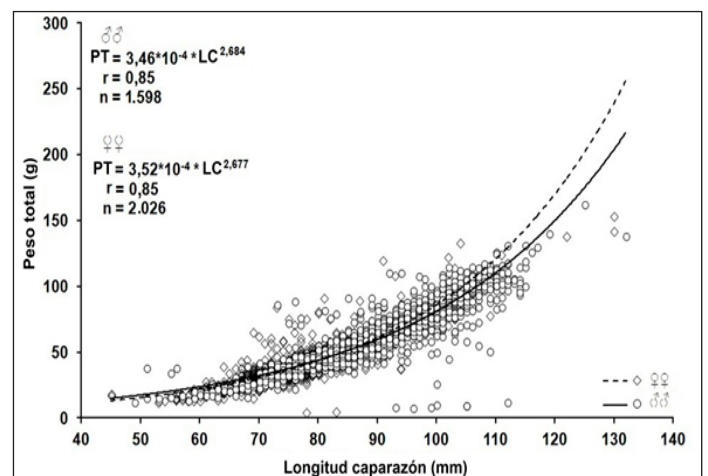


FIGURA 4. RELACIÓN LONGITUD-PESO DE MACHOS (♂♂) Y HEMBRAS (♀♀) DE *Callinectes danae*



sucesivas pueden crecer de forma diferente según las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, calidad de hábitat, disponibilidad de alimento) y en función del sexo [34].

La edad límite diferente de machos y hembras, puede ser atribuible a un valor mayor de  $k$  para las hembras, alcanzando la longitud asintótica en menos tiempo. El menor valor del coeficiente de crecimiento de los machos indica que su crecimiento es más lento y por consiguiente tienen un ciclo de vida más largo para lograr alcanzar la longitud asintótica. Estos resultados discrepan con los obtenidos en *C. danae* de la Laguna de Conceição, Florianópolis, Brasil [8] y *C. arcuatus* y *C. bellicosus* de la laguna Las Guásimas, México [17]. También la diferencia de la longevidad entre los sexos puede estar relacionada con la calidad del hábitat, alimentación y estrés físico o fisiológico [1].

El coeficiente de variación (CV) del Phi prima ( $\emptyset'$ ) fue de 7% en machos y 8% en hembras (TABLA III), lo que demuestra diferencia en el patrón de crecimiento de *C. danae* de Venezuela (isla de Margarita) y Brasil (Florianópolis y Río de Janeiro). Los parámetros de crecimiento varían a menudo en función del sexo o condición reproductiva, en particular, los crustáceos se ven afectados y de manera intermitente por los procesos de muda [34], lo que permite explicar las divergencias entre los parámetros de crecimiento calculados para la misma especie en diferentes zonas, y concluir que no se puede hacer una generalización del crecimiento, porque estas discordancias se relacionan con las características ambientales de cada área. En este sentido,

podría deberse a que son estimaciones realizadas con distintos procedimientos de análisis de datos, tamaños de muestra, métodos de captura y selectividad de los artes de pesca [27].

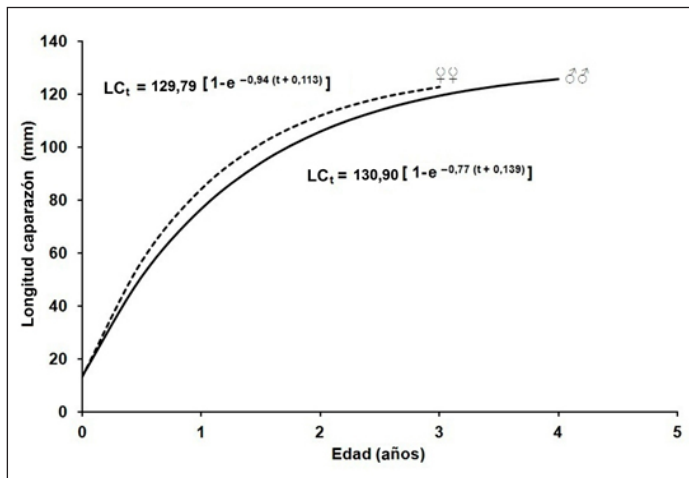
Las curvas de crecimiento en longitud de machos y hembras (FIG. 5) describieron comportamiento de tipo exponencial; observándose un rápido crecimiento hasta 0,5 a de vida, para luego disminuir hasta alcanzar la longitud asintótica; mientras que las curvas de crecimiento en peso de machos y hembras, representaron curvas de tipo sigmoideo, hasta 0,5 a el incremento es lento, luego se acelera y después se produce una inflexión haciéndose el crecimiento cada vez más lento acercándose asintóticamente a su peso máximo (FIG. 6). Estas ecuaciones de crecimiento se ajustaron a la mayoría de los datos observados, y pueden incorporarse fácilmente a modelos de evaluación de poblaciones [15].

**Mortalidad**

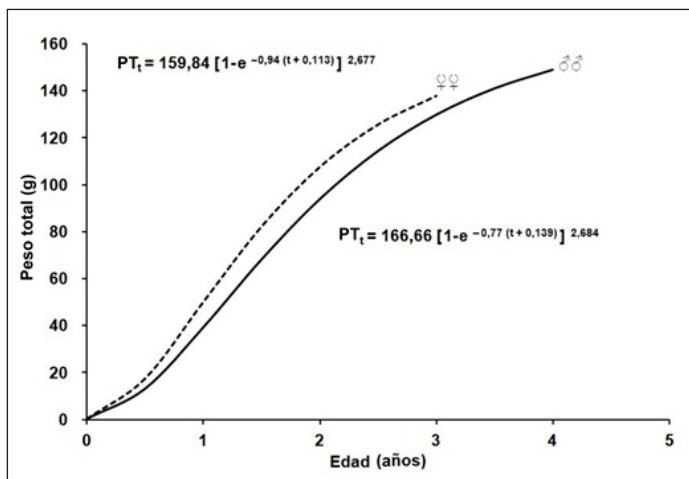
La mortalidad natural establecida para *C. danae* fue  $M = 1,19 a^{-1}$  en machos y  $M = 1,77 a^{-1}$  en hembras, posiblemente las estimaciones fueron altas por el valor elevado del coeficiente de crecimiento ( $k$ ). Un organismo que alcanza la longitud asintótica rápidamente,  $k$  es elevado y probablemente tenga una mortalidad natural elevada [15]. Estos parámetros de crecimiento pudieran tener una respuesta fisiológica explicada por la relación entre el índice metabólico y el peso corporal, dado que las especies pequeñas ingieren alimentos y respiran a mayor velocidad por

**TABLA III**  
**PARÁMETROS DE CRECIMIENTO DE *Callinectes danae***  
**ESTIMADOS POR DIFERENTES AUTORES**

Sexo	Parámetros de crecimiento		$\emptyset'$	Fuente
	$LC_{\infty}$ (mm)	$k$ (año <sup>-1</sup> )		
♂♂	131	0,77	4,12	Presente estudio
	134,8	0,86	4,09	Castillo y col. (2011)
	120	1,80	4,68	Keunecke y col. (2008)
	140	0,69	3,96	Branco y Masunari (1992)
<b>X= 4,21; DE = ± 0,28; CV = 7%</b>				
♀♀	130	0,94	4,20	Presente estudio
	122,35	0,63	3,72	Castillo y col. (2011)
	111	1,80	4,61	Keunecke y col. (2008)
	133	0,65	3,86	Branco y Masunari (1992)
<b>X= 4,10; DE = ± 0,34; CV = 8%</b>				



**FIGURA 5. CURVAS DE CRECIMIENTO EN LONGITUD, SEGÚN EL MODELO DE VON BERTALANFFY (1938) DE MACHOS (♂♂) Y HEMBRAS (♀♀) DE *Callinectes danae***



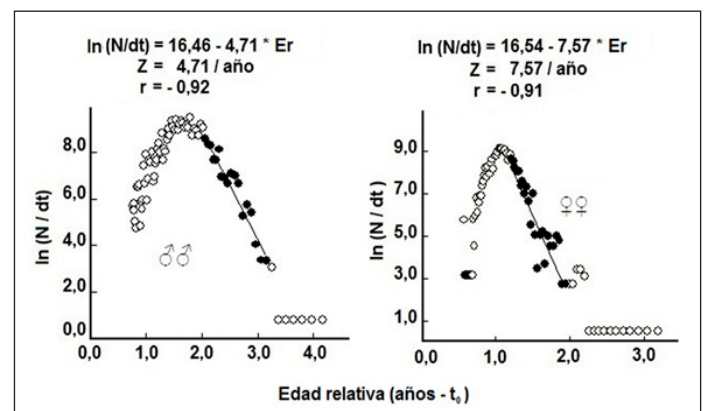
**FIGURA 6. CURVAS DE CRECIMIENTO EN PESO, SEGÚN EL MODELO DE VON BERTALANFFY (1938) DE MACHOS (♂♂) Y HEMBRAS (♀♀) DE *Callinectes danae***

unidad de peso corporal que las especies más grandes [18].

La mortalidad natural siempre es considerada como un factor constante de incertidumbre que afecta por igual y en forma permanente, pero puede variar con el crecimiento de la cohorte y entre cohortes en función de las variables ambientales, como la temperatura del agua y la salinidad. Es difícil encontrar reportes sobre mortalidad natural de cangrejos del género *Callinectes*; sin embargo, se podría decir que las estimaciones no fueron tan altas si se comparan con la  $M = 2,5 \text{ a}^{-1}$  de *C. sapidus* para ambos sexos del Lago de Maracaibo [37], no obstante, fue alta al contrastar con la  $M = 0,66 \text{ a}^{-1}$  de *C. sapidus* machos de la bahía de Chetumal, Quintana Roo, México [31]. Los individuos de una misma especie pueden tener diversas causas de mortalidad natural en diferentes áreas dependiendo de la cantidad de depredadores y

competidores existentes, enfermedades, inanición y vejez, cuya abundancia de la especie está influenciada por la pesca [34].

La mortalidad por pesca  $F = 3,52 \text{ a}^{-1}$  en machos y  $F = 5,80 \text{ a}^{-1}$  en hembras fue alta y no puede ser considerada como una constante, porque está sujeta a la presión de pesca ejercida por los deseos o habilidades del hombre [11]. Así mismo, la tasa de mortalidad total  $Z = 4,71 \text{ a}^{-1}$  en machos y  $7,57 \text{ a}^{-1}$  en hembras (FIG. 7), lo que sugiere un fuerte impacto de la pesca, cuyo efecto directo puede causar cambios en la abundancia, en relación a un ecosistema en equilibrio, y también en la estructura de tallas con una reducción de las longitudes máximas [34]. Evidentemente, la alta tasa de mortalidad total asociada a la mortalidad por pesca ( $F$ ) de machos y sobre todo de hembras, sugiere reducir el esfuerzo pesquero y proteger a las hembras, aunque la pesca excesiva de machos también podría afectar el reclutamiento y/o la vulnerabilidad genética [2]. Esto se podría lograr estableciendo refugios en la boca y dentro de la laguna de Las Marites durante el periodo de máxima actividad reproductiva que ocurre en el primer semestre del año y con mayor intensidad en febrero [29].



**FIGURA 7. ESTIMACIÓN DE LA MORTALIDAD TOTAL (Z) A PARTIR DEL MÉTODO DE LA CURVA DE CAPTURA LINEALIZADA DE MACHOS (♂♂) Y HEMBRAS (♀♀) DE *Callinectes danae***

## CONCLUSIONES

El cangrejo *C. danae* de La Isleta, isla de Margarita presenta dimorfismo sexual respecto a la talla, diferencia en la proporción sexual y crecimiento isométrico en ambos sexos. Las hembras crecen a mayor velocidad que los machos, pero con una esperanza de vida más corta. El índice de desempeño Phi prima indica que existe diferencia en el patrón de crecimiento, por lo que se sugiere como medida de manejo considerar la talla mínima de captura, debido a la variabilidad en el crecimiento. Por otro lado, los valores altos de las mortalidades, sugieren reducir la tasa de mortalidad por pesca y proteger las hembras, estableciendo refugios en la boca y dentro de la laguna de Las Marites durante el periodo de máxima actividad reproductiva.

## AGRADECIMIENTO

Expresamos nuestro agradecimiento al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por el cofinanciamiento parcial del proyecto: "Biometría y pesquería del cangrejo *C. danae* de La Isleta, isla de Margarita" CI-06-060402-1798/2012. A los pescadores de la comunidad de La Isleta, por su apoyo logístico en la obtención de las muestras biológicas. A los Árbitros de la Revista Científica por la lectura y sugerencias al manuscrito.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABOWEI, J.F.N.; GEORGE, A.D.I.; DEEKAE, S.N. The Age and Growth of *Callinectes* *amicola* (De Rochebrune, 1883) from Okpoka Creek, Niger Delta, Nigeria. **Int. J. Anim. Vet. Adv.** 1(2): 73-82. 2009.
- [2] ALLENDORF, F.W.; HARD, J.J. Human-induced evolution causes by a natural selection through harvest of wild animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 106: 9987-9994. 2009.
- [3] ARAÚJO, M.; BARRETO, A.; NEGROMONTE, A.; SCHWAMBORN, R. Population ecology of the blue crab *Callinectes danae* (*Crustacea: Portunidae*) in a Brazilian tropical estuary. **An. Acad. Bras. Cien.** 84(1): 129-138. 2012.
- [4] ARIZA, L.A.; NÚÑEZ, J.A.; RUIZ, L.; MÉNDEZ, E. Estructura y parámetros poblacionales de tres especies de jaibas de la familia Portunidae (*Decapoda-Brachyura*) de fondos blandos de la zona costera de Cumaná, Sucre-Venezuela. **Bol. Inst. Oceanogr. Vzla.** 56(2): 31-41. 2017.
- [5] ARREGUIN-SÁNCHEZ, F.; SÁNCHEZ, J.A.; DEFEO, O. Análisis del crecimiento de la almeja amarilla (*Mesodesma mactroides*) de la costa uruguaya en base a datos de composición por longitudes. **Frente Marítimo.** 9: 75-81. 1991.
- [6] ASSUNÇÃO, F. Distribuição espaço-temporal e dinâmica populacional do siri *Callinectes danae* Smith, 1869 (*Decapoda: Portunidae*) na Região adjacente à Baía de Babitonga, Santa Catarina. Universidade Estadual Paulista, Assis. **Tesis de Maestria.** 71 pp. 2014.
- [7] BAPTISTA-METRI, C.; PINHEIRO, M.; BLANKESTEIYN, A.; BORZONE, C. Biología populacional e reproductiva de *Callinectes danae* Smith (*Decapoda: Portunidae*). **Rev. Bras. Zool.** 22(2): 446-453. 2005.
- [8] BRANCO, J.; MASUNARI, S. Crecimiento de *Callinectes danae* Smith (*Decapoda: Portunidae*) da Lagoa da Conceição, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 9(1-2): 53-66. 1992.
- [9] BRANCO, J.; MASUNARI, S. Reproductive ecology of the blue crab *Callinectes danae* Smith, 1869 in the Conceição Lagoon system, Santa Catarina Isle, Brazil. **Rev. Bras. Biol.** 60(1): 17-27. 2000.
- [10] CASTILLO, J.; ESLAVA, N.; GONZÁLEZ, L.W. Crecimiento del cangrejo *Callinectes danae* (*Decapoda: Portunidae*) de la Isla de Margarita, Venezuela. **Rev. Biol. Trop.** 59(4): 1525-1535. 2011.
- [11] CSIRKE, J. Introducción a la Dinámica de Poblaciones de Peces. FAO. **Doc. Tec. Pesca.** 192. 82 pp. 1980.
- [12] GAYANILO, F.C. Jr.; SPARRE, P.; PAULY, D. FAO-ICLARM Stock Assessment Tools II (FiSAT II). Revised version. User guide. **FAO Computerized Information Series.** (Fisheries). No. 8. Revised version. Rome, FAO. 168 pp. 2005.
- [13] GIL, L.H. Aspectos ecológicos, biológicos y pesqueros de las jaibas (*Callinectes* spp.) en el sistema lagunar Mar Muerto, Oaxaca-Chiapas, México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nayarit. Agropecuarias Área de Ciencias Biológico. 81 pp. 2009.
- [14] GONZÁLEZ, L.W.; ANTÓN, O. Pesca artesanal del cangrejo *Callinectes danae* (*Decapoda: Portunidae*) en La Isleta, isla de Margarita, Venezuela. **Cien.** 22(1):5-13. 2014.
- [15] GULLAND, J. Crecimiento. En: Manual de métodos para la evaluación de las poblaciones de peces. Zaragoza, España: Editorial Acribia. 154 pp. 1971.
- [16] HENDRICKX, M.E. Cangrejos. En: Guía FAO para la identificación de especies para los fines de pesca. Pacífico Centro Oriental. Vol. I. Plantas e invertebrados. Fischer, W.; Krupp, F.; Schneider, W.; Sommer, C.; Carpenter, K.E.; Niem, V.H. (Eds.) FAO, Roma, Italia. Pp. 565-636. 1995.
- [17] HERNÁNDEZ, L.; ARREOLA, J. Estructura de tallas y crecimiento de los cangrejos *Callinectes arcuatus* y *C. bellicosus* (*Decapoda: Portunidae*) en la laguna costera Las Guásimas, México. **Rev. Biol. Trop.** 55 (1): 226-233. 2007.
- [18] HILL, R.; WYSE, M.; ANDERSON, M. Metabolismo energético. En: **Fisiología animal.** Caracas: Panamericana. 916 pp. 2006.
- [19] KEUNECKE, K.; D'INCAO, F.; MOREIRA, F., SILVA, D.; VERANI, J. Idade e crescimento de *Callinectes danae* e *C. ornatus* (*Crustacea: Decapoda*) na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia, Iheringia, Ser. Zool.** (2): 231-235. 2008.

- [20] LÓPEZ, F. Cambios en el nivel trófico de la laguna de Las Marites. Escalas y perspectivas. Universidad de Oriente, Cumaná. **Tesis de Doctorado**. 136 pp. 2013.
- [21] NEVÁREZ-MARTÍNEZ, M.O.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J.; CERVANTES-VALLE, C.; MIRANDA-MIER, E.; MORALES-AZPEITIA, R.; ANGUIANO-CARRASCO, M.L. Evaluación biológico-pesquera de las jaibas *Callinectes bellicosus* y *Callinectes arcuatus* (*Brachyura: Decapoda: Portunidae*) en las bahías de Guásimas y Lobos, Sonora. In: Contributions to the study of East Pacific Crustaceans. **Hendrickx M.E. (Ed.)**. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 125-138. 2003.
- [22] PAULY, D. Theory and management of tropical multispecies stocks: a review, with emphasis on the Southeast Asian demersal fisheries. ICLARM. **Stud. Rev.1**. 35 pp. 1979.
- [23] PAULY, D. Length converted catch-curves: A potential tool for fisheries research in the tropics (Part I). **Fishbyte**. 1: 9-13. 1983.
- [24] PAULY, D.; MUNRO, L. Once more on growth comparison in fish and vertebrates. **Fishbyte**. 2: 1-21. 1984.
- [25] PÉREZ-ZABALLOS, J.; DÍAZ, J.A.; GARCÍA-MORENO, A. Modelos adaptativos en Zoología. Manual de prácticas 2. Tamaño, forma y alometría. Reduca (Biología). **Serie Zoología**. 2(2): 20-30. 2009.
- [26] PETRIELLA, A.; BOSCHI, E. Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. **Invest. Mar**. 25: 135-157. 1997.
- [27] POPE J.A.; MARGETTS, A.R.; HAMLEY, J.M.; AKYÜZ, E.F. Manual de métodos para la evaluación de poblaciones de peces. Parte 3. Selectividad del arte de pesca. **Doc. Tec. Pesca**. FAO 41/1.Roma, Italia. 56 pp. 1983
- [28] POWELL, D. Estimation of mortality and growth parameters for the length frequency of a catch. Raport process – V **Reunion Conseil International pour L'Exploitation de la Mer**. 175: 167-169. 1979.
- [29] QUIJADA, I. Dinámica reproductiva del cangrejo *Callinectes danae* Smith, 1869 (*Decapoda: Portunidae*) de La Isleta, isla de Margarita, durante el periodo enero-diciembre 2014. Universidad de Oriente, Boca del Río. **Tesis de Grado**. 43 pp. 2017.
- [30] RODRÍGUEZ, G. Suborden Brachyura. En: Crustáceos decápodos de Venezuela. **Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas**. Caracas. 494 pp. 1980.
- [31] ROSAS-CORREA, C.; DE JESÚS-NAVARRETE, A. Parámetros poblacionales de la jaiba azul *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) en la bahía de Chetumal, Quintana Roo, México. **Rev. Biol. Mar. Oceanogr**. 43(2): 247-253. 2008.
- [32] RICKER, W. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. **Bull. Fish. Res. Bd. Can.** 191. 382 pp. 1975.
- [33] RIKHTER, V.A.; EFANOV, V.N. On one of the approaches to estimation of natural mortality of fish populations. **ICNAF Res.Doc**. 76/8: 1-12.1976.
- [34] SPARRE, P.; VENEMA, S. Introducción a la evaluación de los recursos pesqueros tropicales. Parte 1. Manual. FAO. **Doc. Tec. Pesca**. 306/1. Rev.1. Valparaíso, Chile. 420 pp. 1997.
- [35] TAYLOR, C. Growth equations with metabolic parameter. **Internat. Council for the Explorat. Sea**. 27(3): 270-286. 1962.
- [36] VAN ENGEL, W. The blue crab and its fishery in Chesapeake Bay. Part 1. Reproduction, early development, growth, and migration. U. S. Fish Wildl. Serv. Commer. **Fish. Rev**. 24(6): 6–17.1958.
- [37] VILLASMIL, L.; MENDOZA, J.; FERRER, O. Crecimiento y mortalidad del cangrejo azul *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, del Lago de Maracaibo. **Cien**. 5(1): 7-15. 1997.
- [38] VON BERTALANFFY, L. A quantitative theory of organic growth. **Hum. Biol**. 10(2): 181-213.1938.
- [39] WETHERALL, J. A new method for estimating growth and mortality parameters from length-frequency data. **Fishbyte**. 4: 12-14. 1986.
- [40] WILLIAMS, A. Shrimp lobster and crabs of the Atlantic coast of the Eastern Unites States, Maine to Florida. Washington D.C, **Smithsonian Institution Press**. XVII. 550 pp. 1974.
- [41] ZAR, J. Testing for goodness of fit. In: Biostatistical analysis. New Jersey: **Prentice Hall**, Inc. 662 pp. 1996.

# FACTORES ECOEPIDEMIOLOGICOS RELACIONADOS CON LA SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*Trypanosoma (Schizotrypanum) Cruzi* EN HABITANTES AUTÓCTONOS DE COMUNIDADES DE ISLA MARGARITA, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA

## Ecoepidemiological Factors Related To Seroprevalence Of Anti-*Trypanosoma (Schizotrypanum) Cruzi* Antibodies In Autochthonous Inhabitants Of Communities From Margarita Island, Nueva Esparta State, Venezuela.

Antonio Morocoima<sup>1</sup>, Oriana Carías-Sojo<sup>1</sup>, Elizabeth Ferrer<sup>2</sup>, Leonardo De Sousa<sup>3</sup>, Servio Urdaneta-Morales<sup>4</sup>  
<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Oriente y Núcleo de Anzoátegui, Venezuela.

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Universidad de Carabobo, Núcleo de Aragua, Venezuela. <sup>3</sup>Laboratorio de Toxinología, Grupo de Investigación en Toxinología Aplicada y Animales Venenosos, Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente, Núcleo de Anzoátegui, Venezuela. <sup>4</sup>Laboratorio de Biología de *Trypanosoma* de Mamíferos, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Autor de Correspondencia.  
Correo electrónico: tropism2006@yahoo.es

### RESUMEN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, cuyo agente etiológico es el hemoflagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) es una parasitosis pandémica que se extiende a lo largo del Neotrópico. En Venezuela es endémica en todos los Estados, con excepción de Delta Amacuro y Nueva Esparta. El objetivo de este estudio epidemiológico descriptivo, de campo y de corte transversal fue determinar la presencia de anticuerpos circulantes anti-*T. cruzi* en este último Estado, mediante el uso de los tests de Hemaglutinación Indirecta (HI), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Ensayo Inmunoenzimático (ELISA). La metodología fue aplicada a muestras de suero, tomadas a 420 pobladores autóctonos de las comunidades Fuentidueño y Sabana de Guacuco. Asimismo se registró el hallazgo de factores epidemiológicos de riesgo que facilitan el establecimiento y transmisión de la infección en humanos y otros mamíferos. La información obtenida fue analizada mediante el test de cálculo de diferencias entre proporciones (valor de z) con muestreo independiente, considerándose significativos los valores con  $P < 0,05$ . La evaluación de la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* mostró valores de 6,9% de seropositividad global, 5,4 y 5,6% en los habitantes de menor edad, 0-9 años (a) y 10-19, respectivamente, los individuos de mayor edad (50-79 a) mostraron valores de 30 y 50%, respectivamente. Se discuten estos resultados y los factores de riesgo observados, los cuales indican con precisión la existencia en las comunidades estudiadas de transmisión activa de infección- enfermedad por *T. cruzi*, los

cuales resaltan por la condición turística de la isla. Se enfatizan las medidas que deben ser implementadas en esta región en pro de la prevención y control de la enfermedad, con el objeto de reducir su transmisión vectorial, oral y transfusional.

**Palabras clave:** enfermedad de Chagas; seroprevalencia; Estado Nueva Esparta; Venezuela

### ABSTRACT

Chagas' disease or American Trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) is a pandemic parasitosis spreaded alongside the Neotropic; in Venezuela is endemic in all States except in Delta Amacuro and Nueva Esparta. The aim of this descriptive, epidemiological, field and cross-section study was to detect circulating anti-*T. cruzi* antibodies in autochthonous inhabitants from two communities of the last State by Indirect Hemagglutination, Indirect Immunofluorescence and Immunoenzimatic Essay tests, that were applied to 420 autochthonous inhabitants from Fuentidueño and Sabana de Guacuco communities. Also, was reported the epidemiological risk factors that may facilitate the establishment and transmission of the human infection and others mammals. The information obtained was analyzed by calculation of differences between proportions test (z value) with independent sampling, considering values as significant with  $P < 0.05$ . The evaluation of the presence of anti-*T. cruzi* antibodies showed values of 6.9% global seropositivity, 5.4 and 5.6% in younger inhabitants, 0-9 years (y) and 10-19 y, respectively. Older

individuals 50-79 y showed values of 30 and 50 %, respectively. These results are discussed and the risk factors observed, which indicate with precision the active transmission of the infection-disease by *T. cruzi* in the communities studied, which stand out for the tourist condition of the island. The measures that should be implemented in this region are emphasized for the prevention and control of the disease, in order to reduce its vector, oral and transfusional transmission.

**Key words:** Chagas' disease; seroprevalence; Nueva Esparta State; Venezuela

## INTRODUCCIÓN

*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909, agente etiológico de la parasitosis metaxénica enfermedad de Chagas (eCh) o Tripanosomiasis americana, es un hemoflagelado (Protozoa, Kinetoplastida, Trypanosomatidae), ecléctico que posee una elevada y considerable heterogeneidad intraespecífica y plasticidad ecológica. Estas propiedades le permiten una amplia biodiversidad hospedadora que lo capacita a utilizar cerca de 200 especies de mamíferos marsupiales y placentarios estrictamente americanos, los cuales son considerados reservorios válidos al desarrollar numerosas y complejas propiedades, entre otras, niveles de parasitemia que garanticen la infección de unas 150 especies de insectos hematófagos generalistas (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) de muy elevada diversidad, los cuales actúan como vectores comprobados o potenciales del flagelado. Todo ello habilita al parásito a circular en diversos ambientes (nichos y hábitats) que conforman biocenosis ecoepidemiológicas extremadamente complejas y dinámicas, silvestres, las más primitivas, domésticas y peridomésticas dispersándose así en todos los biomas y estratos del Neotrópico [15, 23, 29]. Esta parasitosis es, en la actualidad, una zoonosis pandémica por cuanto se distribuye desde las regiones Neártica y Neotropical (Salt Lake City, 41° N, EUA, hasta 56° S en la Patagonia argentina) y algunas islas caribeñas. Las constantes migraciones desde estas regiones han extendido el mal hacia 21 países no endémicos de Europa, Asia y Oceanía [ 16, 18, 19]. Sin embargo, iniciativas oficiales (Andina, América Central, Cono Sur y Amazonas) han logrado controlar la transmisión vectorial en estas regiones por lo cual se estima que actualmente la población en riesgo de adquirir la parasitosis sumaría unos 25 millones de personas y, en consecuencia, 6-7 millones estarían infectados con una mortalidad anual de siete mil [40].

La ecoepidemiología de la eCh es una de las más complejas de todas las enfermedades humanas transmitidas por vectores afectando principalmente a poblaciones pobres, remotas e ignoradas con acceso limitado a los servicios de salud, por lo cual se expresa como una enfermedad que posee una muy elevada carga de morbimortalidad y de impacto psicológico, social y económico y, por ello, es considerada la infección parasítica más importante del Neotrópico [5, 12].

La distribución geográfica de la eCh en Venezuela comprende

todos los estados exceptuando Delta Amacuro y Nueva Esparta [1-3, 6-9, 14, 28, 32, 33, 35, 38], por lo cual no son considerados áreas endémicas para la eCh y, por ello, no están incluidos en el Programa de Control de la enfermedad implementado en el país en la década del año 1960, con el propósito de interrumpir la transmisión intradoméstica desarrollada por *Rhodnius prolixus*, el vector más importante del país [14].

En este trabajo se propone contribuir a determinar el grado de compromiso que pudiese involucrar a los habitantes de la Isla Margarita (Estado Nueva Esparta) en relación con la tripanosomiasis, dilucidando algunos factores ecoepidemiológicos a los cuales se enfrenten. Asimismo, se precisa la seroprevalencia de *T. cruzi* detectada en dos comunidades del estado con el objeto de evidenciar la magnitud, trascendencia y carácter autóctono de la enfermedad de Chagas como enfermedad desasistida en esta área geográfica del país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Áreas de estudio

El estado Nueva Esparta, archipiélago constituido por las islas Margarita, Coche y Cubagua, está ubicado al noreste del país, limitando con el mar Caribe. Comprende áreas semiáridas con temperatura anual promedio de 29°C y áreas semiáridas montañosas, templadas y frías con temperatura anual promedio de 20°C y altitud de 350 metros sobre el nivel del mar (m. s. n. m.)

Las comunidades estudiadas fueron: Fuentidueño localizada a N 11° 0' 59"; W 63° 56' 59", ubicada en el municipio Antonio Díaz de la ciudad San Juan Batista y Sabana de Guacuco localizada a N 11° 01' 40"; W63° 51' 28", ubicada en el municipio Arismendi de la ciudad La Asunción, las cuales presentaron poblaciones de 1236 y 826 individuos, respectivamente, según información obtenida del censo poblacional del estado Nueva Esparta realizado en el año 2014.

A las personas que aceptaron participar en la investigación, 219 de la comunidad Fuentidueño y 201 de la comunidad Sabana de Guacuco se les informó, de manera sencilla, los objetivos y ventajas del estudio y aprobaron por escrito su consentimiento de colaborar voluntariamente; en el caso de los menores de edad se requirió la autorización de sus representantes. Por otra parte, se les aplicó un cuestionario, que cumplió con los criterios de bioética establecidos en la Convención de Helsinki de la Asociación Médica Mundial [10], el cual produjo información sobre indicadores personales, socioeconómicos y demográficos así como sobre factores de riesgo (tipo de vivienda, presencia de animales, tiempo (años -a-) del encuestado habitando en el estado y nivel de conocimiento de la eCh.

### Derminación serológica de la infección por *Trypanosoma cruzi*

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS)

**TABLA I**  
**SEROPREVALENCIA FRENTE A *Trypanosoma cruzi* OBTENIDA DETECTADA EN HABITANTES DE COMUNIDADES RURALES DE ISLA MARGARITA, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA**

	Total	Anticuerpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>		p
	n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Número (n)	420 (100)	29 (6,9)	391 (93,1)	
Comunidad				
Fuentidueño*	219 (52,1)	4 (1,8)	215 (98,2)	-
Sabana de Guacuco	201 (47,9)	25 (12,4)	176 (87,6)	<0,001
Género				
Femenino*	239 (56,9)	22 (9,2)	217 (90,8)	-
Masculino	181 (43,1)	7 (3,9)	174 (96,1)	0,032
Edad (años)				
0-9*	80 (19,0)	2 (2,5)	78 (97,5)	-
10-19	50 (11,9)	1 (2,0)	49 (98,0)	0,034
20-29	56 (13,3)	3 (5,4)	53 (94,6)	0,759
30-39	58 (13,8)	0 (0,0)	58 (100,0)	0,225
40-49	47 (11,2)	0 (0,0)	47 (100,0)	0,274
50-59	46 (11,0)	10 (21,7)	36 (78,3)	<0,001
60-79	83 (19,8)	13 (15,7)	70 (84,3)	0,004

\* Categoría de Referencia

[30] la eCh requiere, al menos, dos pruebas serológicas para la obtención de resultados confiables en la detección de infección por *T. cruzi* y en caso de discrepancia una tercera prueba; según Dumonteil y Herrera [12], la considerable heterogeneidad genética y antigénica del parásito sería la causa de esta situación. Por ello se utilizaron los siguientes tests inmunoserológicos considerados los de mayor sensibilidad y confiabilidad para la especie de este tripanosoma: Hemaglutinación Indirecta (HAI), Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Ensayo Inmunoenzimático ELISA. Las muestras se estimaron positivas cuando se obtuvo reacción anti-*T. cruzi* en dos de los tres métodos empleados [34].

Para ello se obtuvo asépticamente, de cada participante, una muestra de 7 mililitros (mL) de sangre, mediante punción venosa antero braquial que fue dispensada en un tubo para hematología sin anticoagulante (Tubo tapa roja. Vacutainer. Vacutainer Blood Collect Tube. Vacutainer™ Becton, Dickinson, Becton Dickinson de Colombia Ltda. Cundinamarca, Colombia), identificando a cada participante. Los sueros fueron separados por centrifugación (Centrifuga Labnet Hermle Z 300 K, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania) a 1100 x G durante 10 minutos (min) colocados en viales por duplicado en alícuotas de 500 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) y congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Congelador Freezer, Whirlpool, Modelo #: WZF34X20DW, Whirlpool, Benton Harbor, Michigan, EUA) hasta su procesamiento. La infección

por *T. cruzi* mediante la detección de anticuerpos circulantes específicos contra el parásito se realizó en el Centro de Medicina Tropical (CMT-UDO) de la Escuela de Ciencias de la Salud, Núcleo de Anzoátegui, Universidad de Oriente y en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay [4, 13].

Los anticuerpos anti-*T. cruzi* poseen la capacidad de aglutinar de manera específica a glóbulos rojos que hayan sido sensibilizados con sus antígenos relacionados; para esta determinación se utilizó el protocolo de la prueba comercial Chagatest® Wiener Lab., Argentina [41]; los procedimientos y la interpretación de los resultados fueron realizados estrictamente según las indicaciones del fabricante.

Para el test de IFI se utilizaron como antígeno proteínas formalizadas de epimastigotes de *T. cruzi* obtenidos de la cepa autóctona Ory14 (Tc DTU III) [26] cultivada axénicamente en medio LIT (Liver Infusion Tryptose, Difco, EUA), incubado a  $27^{\circ}\text{C}$  (Nevera Refrigerator Whirlpool, Model #: WRT348FMEZ, Whirlpool, Benton Harbor, Michigan, EUA) suplementado con suero bovino fetal al 10% y solución de sulfato de gentamicina (80 miligramos-mg/L, fijándolos en láminas para inmunofluorescencia. A cada uno de los sueros se les agregó, para cada determinación, anti IgG/IgM humana marcada con fluoresceína observándose (400X)

**TABLA II**  
**SEROPREVALENCIA FRENTE A *Trypanosoma cruzi* DE ACUERDO AL GÉNERO LOS GÉNEROS DE HABITANTES DE**  
**COMUNIDADES DE ISLA MARGARITA, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA**

	Total n (%)	Anticuerpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>		
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	p
Fuentidueño	219 (100)	4 (1,8)	215 (98,2)	-
Género				
Femenino*	130 (59,4)	4 (3,1)	126 (96,9)	-
Masculino	89 (40,6)	0 (0,0)	89 (100)	0,094
Sabana de Guacuco	201 (100)	25 (12,4)	176 (87,6)	-
Género				
Femenino*	109 (54,2)	18 (16,5)	91 (83,5)	-
Masculino	92 (45,8)	7 (7,6)	85 (92,4)	0,057

\* Categoría de Referencia

con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400, Epi-Fluorescence Microscope, Nikon®, San Francisco, California, EUA). La presencia de fluorescencia de color verde se consideró como prueba positiva, determinando su grado de intensidad utilizando un control positivo.

El test de ELISA se realizó utilizando el kit serológico comercial Test ELISA CHAGAS III®-BiosChile [20].

### Muestra poblacional y análisis estadístico

La determinación del tamaño de la muestra para cada localidad, se realizó utilizando la siguiente fórmula:  $n = (K^2 \times N \times PQ) / (e^2 \times N) \times (K^2 \times PQ)$ . Donde: K = 1,96 (nivel de confiabilidad), P = 0,5 (probabilidad de aceptación), e = 0,06 (error de estudio), Q = 0,5 (probabilidad de rechazo), N = tamaño de la población, n = número de pacientes a estudiar. Los datos ordenados y tabulados fueron analizados por el uso del test de cálculo de diferencias entre proporciones (valor de z) con muestreo independiente. Se consideraron significativos los valores con  $P < 0,05$  [17].

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 420 muestras analizadas, 29 (6,9%) resultaron positivas y de éstas 4/219 (1,8%) fueron de la comunidad Fuentidueño y 25/201 (12,4%) de Sabana de Guacuco. De acuerdo al género, 239 (56,9%) individuos pertenecieron al género femenino y 181 (43,1%) al género masculino (relación 1,3♂:1♀) mostrando seropositividades de 9,2 y 3,9%, respectivamente. De acuerdo con la edad, las mayores seroprevalencias se encontraron en individuos mayores de 50 a y menores de 30 (TABLA I); encontrándose diferencias significativas con respecto a la seropositividad en todos los casos estudiados. Detalles sobre hallazgos serológicos, incluyendo distribución por grupos de

edades y significación estadística son mostrados en la TABLA I.

Analizando los datos por comunidades, en Fuentidueño 130 individuos fueron mujeres y 89 hombres, con seropositividades de 3,1 y 0,0%, respectivamente. En Sabana de Guacuco, 109 mujeres y 92 hombres dieron positividad de 16,5 y 7,6%, respectivamente, con valores cercanos a la significancia estadística ( $P= 0,094$  y  $P=0,057$ ) (TABLA II).

El análisis realizado según la edad de los habitantes por cada comunidad (TABLA III) señala que, los individuos más jóvenes (0-9 a y 10-19 a) mostraron infecciones por *T. cruzi* de 5,4 y 5,6%, respectivamente. Por otra parte, las seropositividades más elevadas (30,0 y 50,0%) se ubicaron en los individuos de mayor edad (50-79 a) en la comunidad Sabana de Guacuco, cuyos valores fueron significativamente mayores ( $P<0,001$ ).

El cuestionario aplicado a los habitantes mostró las siguientes frecuencias: 83 y 68% de los habitantes de Fuentidueño y Sabana de Guacuco, respectivamente, son autóctonos de la Isla Margarita por tener entre 60-79 a residiendo permanentemente en esta región, de los cuales 30% visitaron ocasionalmente otros Estados. En Fuentidueño, 10% de sus habitantes declararon ser maestros o comerciantes, 20% agricultores y 55% pescadores; en tanto que 58% cursaron primaria, 25% secundaria y 17% son universitarios. El 60% vivían en casas cuyos techos mostraron palmas (15%) y el resto platabanda o láminas metálicas (zinc o acerolite); paredes construidas con bloques o ladrillos frizados (60%) y 40% de bahareque; pisos con tierra (15%) o cemento (85%). El interior de las viviendas presentó apilamientos de leña y materiales de madera. Las viviendas restantes fueron ranchos que poseían techos con hojas de palmeras (30%) o acerolite (70%); paredes de bahareque agrietadas (35%) o con bloques



**TABLA III**  
**SEROPREVALENCIA FRENTE A *Trypanosoma cruzi* DE ACUERDO AL GRUPO ETARIO DE HABITANTES DE COMUNIDADES DE ISLA MARGARITA, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA**

	Total n (%)	Anticuerpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>		p
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Fuentidueño	219 (100)	4 (1,8)	215 (98,2)	-
Edad (años)				
0-9*	37	2 (5,4)	35 (94,6)	-
10-19	32	0 (0,0)	32 (100)	0,181
20-29	28	1 (3,6)	27 (96,4)	0,727
30-39	28	0 (0,0)	28 (100)	0,211
40-49	25	0 (0,0)	25 (100)	0,237
50-59	26	0 (0,0)	26 (100)	0,228
>60	43	1(2,3)	42 (97,7)	0,469
Sabana de Guacuco	201 (100)	25 (12,4)	176 (87,6)	-
Edad (años)				
0-9*	43	0 (0,0)	43 (100)	-
10-19	18	1(5,6)	17 (94,4)	0,119
20-29	28	2 (7,1)	26 (92,9)	0,075
30-39	30	0 (0,0)	30 (100)	-
40-49	22	0 (0,0)	22 (100)	-
50-59	20	10 (50)	10 (50)	<0,001
>60	40	12 (30)	28 (70)	<0,001

\* Categoría de Referencia

frisados o no; pisos con tierra o cemento (50%) y todas poseían apilamientos de madera, leña y basura. Las casas de Sabana de Guacuco tenían techos con platabanda o zinc o acerolite; paredes con bloques o ladrillos frisados, pisos con tierra o cemento y 50% con apilamientos de basura y madera. Los ranchos mostraron características semejantes a los de la comunidad Fuentidueño. En ambas comunidades se encontraron animales en todas sus casas o en sus alrededores, incluyendo mamíferos domésticos en un 60% (perros (*Canis lupus familiaris*), gatos (*Felis catus*), Cerdo (*Sus scrofa domestica*), burros (*Equus asinus*), cabras (*Capra aegagrus hircus*), vacas (*Bos taurus*), ratones (*Mus musculus*) y 40% sinantrópicos: rabipelados (*Didelphis marsupialis*), cachicamos (*Dasypus novemcinctus*), ratas grises (*Rattus norvegicus*), murciélagos (Orden Chiroptera) en tanto que 75% mostraron además gallinas (*Gallus gallus domesticus*) y lagartos (*Ameiva ameiva*). El hábito de los habitantes de la isla de criar rabipelados y cachicamos para ser usados como fuentes alimenticias debe también ser considerado. En 70% de las inmediaciones de las viviendas se observó la presencia de palmas de coco (*Cocos nucifera*, L. Aracaceae), las cuales según Morocoima y col. [27] se comportan como ecotopos vegetales

excelentes para *R. prolixus* y *Triatoma maculata* presentes en la isla [8], lo cual le confiere a estas palmeras la condición de bioindicadores ambientales de nichos silvestres y peridomésticos de triatominos.

Esta situación muestra adicionalmente, retos a las iniciativas relacionadas con las medidas preventivas o de control vectorial, al señalar la posibilidad de infestación o reinfestación de los domicilios adyacentes mediante traslado activo o pasivo de los insectos y, en consecuencia, de la emergencia o reemergencia de la enfermedad de Chagas, garantizando así el mantenimiento de *T. cruzi* y su transmisión.

En relación con los cocoteros, palmera abundante en regiones forestales, costeras tropicales y subtropicales, posee un fruto con un contenido líquido, "agua de coco", muy nutritivo, sumamente utilizado por los habitantes de la isla, el cual lo ingieren aplicando directamente la boca a las frutas perforadas las cuales pueden permanecer almacenadas hasta su uso permitiendo su contacto con triatominos allí presentes, pudiéndose provocar contaminación oral de la parasitosis, en forma similar a la

discutida por Robertson y col. [33].

Veinte por ciento de los pobladores encuestados mostraron conocimientos sobre la eCh, respondiendo que es transmitida por las heces infectadas de los triatominos al alimentarse del humano y de otros mamíferos; de éstos, 10% conoce que es producida por un parásito transmitido por ingestión de alimentos y bebidas contaminadas. Según el 30% de las respuestas recibidas, la enfermedad de Chagas se cura y 70% lo negó; 50% afirmó que los sitios del cuerpo afectados son los miembros superiores, en tanto que para el 20 y 10%, respectivamente, son la cara y tórax y los miembros inferiores, pudiendo durar 10; 30 o más a según el 60; 30 y 10% de los encuestados.

Luego de que Tejera [35] determinó la presencia de infección por *T. cruzi* en humanos de los estados Trujillo y Zulia transmitida por *R. prolixus*, el Maestro José Francisco Torrealba [36-38] mediante sus investigaciones pioneras asentó las siguientes conclusiones: "En todos los Estados, menos en Nueva Esparta, que es la Isla de Margarita, se han comprobado casos"; "El camino es la destrucción de los triatominos, el mejoramiento de la vivienda rural y el levantamiento del nivel económico del campesinado que tiene que ser labor oficial". Esta alarma que perduró sin repuesta durante casi 60 años motivó este trabajo y los consiguientes resultados, en los cuales se hizo eco de la permanente angustia del maestro quien además clamó porque las autoridades sanitarias iniciaran de inmediato campañas antichagásicas para disminuir los riesgos de infección por la parasitosis.

Los resultados que se presentan en este trabajo evidencian, indudablemente, la existencia de transmisión activa de enfermedad por *T. cruzi* en las comunidades estudiadas de Isla Margarita. Esta situación se relaciona estrechamente con la pérdida de recursos del presupuesto de los organismos de salud que se ha realizado en el país. En efecto, el Programa de control de la eCh (PceCh) se mantuvo exitosamente hasta el repunte de la malaria y del dengue hemorrágico producido durante los años 1980-1990, cuando estos auxilios fueron desviados para combatirlos [14]. Por otra parte, estos resultados están en total conformidad con lo expuesto por Hotez y col. [22], quienes plantearon que la situación económica, política y social que existe en Venezuela ha llevado, entre otras consecuencias lamentables, a enormes recortes presupuestarios, planteado por Añez y col. [2] al analizar el resurgimiento de casos agudos de enfermedad de Chagas en el occidente del país. Ello se expresa por un desabastecimiento casi total de fármacos e insecticidas residuales, así como por el deterioro extremo de las instituciones, tratamientos médicos y la ausencia en salud pública de políticas nacionales y regionales que prioricen la vigilancia epidemiológica y la prevención de la parasitosis lo cual, conjuntamente con el aumento desmedido de la pobreza, han causado la reemergencia histórica de enfermedades tropicales transmitidas por vectores, malaria, leishmaniasis y enfermedad de Chagas entre otras. Por ello, la incidencia, transmisión y diseminación de esta última

se ha intensificado en áreas rurales y hasta urbanas llevando a calificar e incluir esta tripanosomiasis, en referencia al país, dentro de las Enfermedades Tropicales Olvidadas (Neglected Tropical Diseases), sin excluir el compromiso social el cual debe procurar el desarrollo de la salud en la población.

Las seropositividades más elevadas, mostradas por los individuos de mayor edad de la población de Sabana de Guacuco, podrían explicarse por sus múltiples y repetidas exposiciones a triatominos parasitados, los cuales podrían, a su vez, poseer infecciones mixtas con subpoblaciones diferentes de cepas del flagelado, dada la elevada heterogeneidad y plasticidad genética de *T. cruzi*, ya mencionadas y mostrarían, así mismo, que la eCh viene circulando con mayor antigüedad en la población de esta comunidad.

Cambios demográficos, deforestación, alteraciones ambientales y climáticas, uso de la tierra, urbanización desordenada, intensas migraciones son, entre otros, factores epidemiológicos que conducen al establecimiento de infección por eCh [8, 14, 21, 24, 25, 39]. Estas consideraciones se aplican a los resultados obtenidos en el presente estudio, los cuales proveen evidencias suficientes para considerar al estado Nueva Esparta y, en particular, a la Isla Margarita como zonas endémicas para la infección-enfermedad de Chagas, resaltando su importancia en ésta dada su condición de zona turística de las más importantes del Caribe.

Con el propósito de complementar los resultados de este trabajo, se señalan las investigaciones que muestran la presencia en Isla Margarita de infección por *T. cruzi* en *D. novemcinctus* y *Triatoma maculata* capturados en las comunidades Fuentidueño y Los Robles [31].

Los vectores señalados en la isla poseen las propiedades siguientes que son valoradas como factores de riesgo adicionales: *R. prolixus*: intensa antropofilia y adaptación a albergues humanos y diferentes zonas bioclimáticas, elevada eficiencia vectorial mediante ingurgitación voluminosa con inmediata diuresis y liberación de estadios metacíclicos, ciclo de desarrollo rápido que provoca densidades poblacionales elevadas, dispersión pasiva intensa, utilización de numerosas especies de palmas; *T. maculata*: amplia variedad de biotopos y zonas geográficas, ornitófago y peridomiciliar [8].

Por todo lo expuesto, se hace necesario compartir los planteamientos de Añez y col. [2] quienes, repetidamente, han clamado en pro de la creación de una ley que declare en el país la lucha antichagásica como una política de estado con carácter prioritario.

## CONCLUSIONES

Los riesgos epidemiológicos y las seropositividades señaladas conforman una situación que debe ser tratada de inmediato por los entes de salud pública del país. Esto implica la implementación

inmediata de programas socio-sanitarios que incluyan mejoras radicales en la infraestructura e higiene de las viviendas. Asimismo, llevar la adecuada educación sobre la enfermedad de Chagas y los factores de riesgo presentes en el estado a miembros de poblaciones locales con el propósito de estimular la participación comunitaria en actividades de vigilancia y control de la dolencia, incluyendo el control de vectores y mejora en la competencia profesional del personal responsable de los centros diagnósticos y en el manejo del paciente chagásico en cualquiera de las fases de la infección y con ello, de la atención médica de las poblaciones infectadas y en riesgo de adquirir la infección; Todo lo anterior acompañado de implementación de prácticas higiénicas en la preparación, transporte y almacenamiento de los alimentos, especialmente de aquellos que se consumen crudos (ensaladas, frutas y sus jugos), además de rociamiento periódico de las casas y sus alrededores con insecticidas; control de los donadores de sangre, órganos y tejidos, así como estrategias para combatir las desigualdades sociales, pobreza y subdesarrollo de la población las cuales les imponen factores de riesgo que las hacen mayormente susceptibles a la parasitosis.

#### CONSIDERACIONES ÉTICAS

Todos los resultados obtenidos en seres humanos fueron conducidos de acuerdo a las Leyes de Bioética actuales dictadas por el Ministerio Venezolano de Ciencia y Tecnología y aprobadas por los Comités de Ética y de Cuidado Animal del Fondo Nacional para Ciencia y Tecnología (FONACIT), Venezuela.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; DÍAZ, N.; AÑEZ-ROJAS, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; AGUILERA, M.; MORENO, G.; GALINDEZ-GIRÓN, I.; SANDOVAL R.; SANDOVAL, I.; VÁSQUEZ, L.; NAVA-RULO, O.; GUERRA, F.; UZCÁTEGUI, G.; YÉPEZ, J.Y.; RODRÍGUEZ, C.; BONFANTE-CABARCAS, R. La cara oculta de la enfermedad de Chagas en Venezuela. **Bol. Malariol. San. Amb.** XLIII: 45-57. 2003.
- [2] AÑEZ, N.; CRISANTE, G.; ROJAS, A. Update on Chagas disease in Venezuela: review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 99: 781-787. 2004.
- [3] AÑEZ, N.; ATENCIO, R.; RIVERO, Z.; BRACHO, A.; ROJAS, A.; ROMERO, M.; CRISANTE, G. Chagas disease inapparent infection in asymptomatic individuals from a Yukpa ethnic community in western Venezuela. **Bol. Mal. Salud Amb.** 51: 59-67. 2011.
- [4] BRICEÑO, D.; CABALLERO, G.; LARES, M.; VIETTRI, M.; MEDINA, M.; FERRER, E. Diagnóstico inmunológico de la Enfermedad de Chagas a partir de muestras colectadas en papel de filtro. **Salus.** 16: 43-52. 2012.
- [5] BRICEÑO-LEÓN, R.; MÉNDEZ-GALVÁN, J. The social determinants of Chagas disease and the transformations of Latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 102 (Supl. 1): 109-112. 2007.
- [6] CARRASCO, H.J.; SEGOVIA, M.; LLEWELYN, S.; MORCOIMA, A.; URDANETA-MORALES, S.; MARTÍNEZ, S.; MARTÍNEZ, C.E.; GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ, M.; ESPINOSA, R.; DE NOYA, B.A.; DÍAZ-BELLO, Z.; HERRERA, L.; FITZPATRICK, S.; YEO, M.; MILES, M.A.; FELICIANGELI, M.D. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. 2012. *Plos. Negl. Trop. Dis.* On Line: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001707>.
- [7] CASTILLO, S.; ÁLVARES, C.; RODRÍGUEZ-BONFANTE, C.; GIL, A.; BONFANTE-CABARCAS, R.; LOYO-ABRERA, Y.; BULLONES, X.; SANTELIS, C.; VALERA, D. Seroprevalencia de *Trypanosoma cruzi* y factores de riesgo en comunidades rurales del municipio Nirgua Estado Yaracuy. **Bol. Med. Postgrado. UCLA.** 20: 73-79. 2004.
- [8] CAZORLA-PERFETTI, D.J. El uso de hongos entomopatógenos para el control biorracional de Triatominae, vectores de la enfermedad de Chagas. **Avances Cardiol.** 31: 333-352. 2011.
- [9] CERMEÑO, J.R. Infección por *Trypanosoma cruzi* en el estado Bolívar, Venezuela. Revisión y actualización. **Saber** 25: 129-140. 2013.
- [10] CONVENCIÓN DE HELSINKI, ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL. Principios Éticos Para la Investigación Médica Con Sujetos Humanos. **Instituto Borja de Bioética.** VI (23):5. 2000.
- [11] COURA, J.R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 108: 962-967. 2013.
- [12] DUMONTEIL, E.; HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. 2017. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* On Line: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005422>.
- [13] FERRER, E.; LARES, M.; VIETTRI, M.; MEDINA, M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.** 31: 277-282. 2013.
- [14] FELICIANGELI, M.D. Control de la enfermedad de Chagas en Venezuela: Logros pasados y retos presentes. **Inter-cien.** 34: 393-399. 2009.
- [15] FLORES-FERRER, A.; MARCOU, O.; WALECKX, E.; DUMONTEIL, E.; GOURBIÉRE, S. Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need?. **Evol. Appl.** 11: 470-487. 2017.

- [16] FRANCO-PAREDES, C.; BOTAZZI, M.E.; HOTEZ, P.J. The unfinished public health agenda of Chagas disease in the era of globalization. 2009. *Plos Negl. Trop. Dis.* On Line: <http://doi.org./journal.pntd.000470>.
- [17] FREUND, J.; SMITH, R. Estadística. **Estadística**. 4ta.Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. Naucalpán de Juárez, México. 611 pp. 1989.
- [18] GARCÍA, M.N.; AGUILAR, D.; GORCHAKOV, R.; ROSSMANN, S.N.; MONTGOMERI, S.P.; RIVERA, H.; WOC-COLBURN, L.; HOTEZ, P.J.; MURRAY, K.O. Case Report: Evidence of autochthonous Chagas disease in Southeastern Texas. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 92:325-330. 2015.
- [19] GONZÁLEZ-GUZMÁN, S.; PICHARDO-AVILA, S.; MIMBRERA-RODRÍGUEZ, E.; CRESCENCIO-TRUJILLO, J.; GASCA-LEYVA, M.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, F.; RIVAS, N.; ALEJANDRE-AGUILAR, R. Seroprevalence of human *Trypanosoma cruzi* infection in the North of Estado de Mexico (sic.). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 50: 839-842. 2017.
- [20] GRUPO BIOS S.A. Test Elisa Chagas III. Santiago de Chile, Chile. Customer Service: ventas @ grupobios.cl. Fax + 562 239 4250.
- [21] GUHL, F. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. **Rev. Biomed.** 20: 228-234. 2009.
- [22] HOTEZ, P.J.; BASÁÑEZ, M.G.; ACOSTA-SERRANO, A.; GRILLET, M.E. Venezuela and its rising vector-borne neglected diseases. 2017. *PLoS Negl. Trop. Dis.* On Line: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005423>.
- [23] JANSEN, A.M.; ROQUE, A.L.R.; XAVIER, S.C.C. *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: general aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In: **American Trypanosomiasis**. Elsevier Inc. E UA. Pp 265-283. 2017.
- [24] MACPHERSON, C.N.L. Human behavior and the epidemiology of parasitic zoonoses. **Int. J. Parasitol.** 35:1319-1331. 2005.
- [25] MESSENGER, L.A.; MILES, M.A.; BERN, C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** 13: 995-1029. 2015.
- [26] MOROCOIMA, A.; CARRASCO, H.J.; BOADAS, J.; CHIQUÉ, J.D.; HERRERA, L.; URDANETA-MORALES, S. *Trypanosoma cruzi* III from armadillos (*Dasypus novemcinctus novemcinctus*) from Northeastern Venezuela and its biological behavior in murine model. Risk of emergency of Chagas' disease. **Exp. Parasitol.** 132: 341-347. 2012.
- [27] MOROCOIMA, A.; CHIQUÉ, J.; ZAVALA-JASPE, R.; DÍAZ-BELLO, Z.; FERRER, E.; URDANETA-MORALES, S.; HERRERA, L. Commercial coconut palm as an ecotope of Chagas disease vectors in north-eastern Venezuela. **J. Vector Borne Dis.** 47: 76-84. 2010.
- [28] MOROCOIMA, A.; CIFUENTES-LAREZ, A.E.; DELGADO-DÍAZ, M.J.; URDANETA-MORALES, S. Mamíferos cinegéticos de Venezuela: riesgos epidemiológicos en la infección con *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XXVIII (1): 32-41. 2018.
- [29] NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Vet. Res.** 40 (2): 26-40. 2009.
- [30] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (O.M.S.). La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana). Nota descriptiva. Marzo. 2017.
- [31] PÉREZ-SALAZAR, M.I.; RONDÓN-SÁNCHEZ, D.S. Estudio de la infección natural y comportamiento biológico de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de triatomíneos y mamíferos procedentes del Estado Nueva Esparta. Universidad de Oriente. Trabajo de Grado. Pp. 48. 2013.
- [32] PIFANO, F. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Venezuela. **Arch. Venez. Med. Trop. Parasitol. Med.** 3: 73-99. 1960.
- [33] ROBERTSON, L.J.; DEVLEESSCHAUBER, B.; ALARCÓN, B.; TORGENSON, P.R. *Trypanosoma cruzi*: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite. *Plos. Negl. Trop. Dis.* 2016. On Line: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.03/03/17>.
- [34] SCHWARZ, G.; LODERSTAEDT, U.; HAHN, A.; HINZ, R.; ZAUTNER, A.E; EIBACH, D.; FISCHER, M.; HAGER, R.M.; FRICKMANN, H. Microbiological laboratory diagnostics of neglected zoonotic diseases (NZDS). **Acta Trop.** 165: 40-65. 2017.
- [35] TEJERA, E. La trypanosomose americaine ou maladie de Chagas au Venezuela. **Bull. Soc. Pathol. Exot.** 12: 509-513. 1919.
- [36] TORREALBA, J.F. Investigaciones sobre Enfermedad de Chagas en Zaraza (Estado Guárico, Venezuela). Otras notas científicas. En: Recopilación.- Fascículo 1. Litografía del Comercio. Caracas, Venezuela. Pp 168. 1943.
- [37] TORREALBA, J.F. Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas en San Juan de los Morros. Estado Guárico, Venezuela. Otras notas científicas. En: Recopilación. Fascículo V. Imprenta Nacional, Caracas, Venezuela. Pp 336. 1956.

- [38] TORREALBA, J.F. Apuntes para la geografía de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. En: **Investigaciones sobre la Enfermedad de Chagas en San Juan de los Morros. Estado Guárico - Venezuela.** Imprenta Nacional, Caracas, Venezuela. Pp 175-193. 1963.
- [39] URDANETA-MORALES, S. Chagas' disease: an emergent urban zoonosis. The Caracas Valley (Venezuela) as an epidemiological model. **Front. Public. Health.** 2: 193-205. 2014.
- [40] WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). Chagas Disease (American trypanosomiasis). 2018. Fact Sheet. [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- [41] WIENER LABORATORIOS. Chagatest. HAI. 2000. Rosario, Argentina. On Line: <http://www.wiener-lab.com.ar>. 20/09/18.



## REVISTA CIENTÍFICA

Vol, XXIX, Nº 3

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en  
Abril 2019, por La Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.*

[www.luz.edu.ve](http://www.luz.edu.ve)  
[www.serbi.luz.edu.ve](http://www.serbi.luz.edu.ve)  
[produccioncientifica.luz.edu.ve](http://produccioncientifica.luz.edu.ve)

## NOTA DEL EDITOR

Tengo a bien informarle a todos los investigadores que han enviado sus contribuciones y que hayan recibido sus correspondientes informes sobre la evaluación de su artículo, que el Comité Editor de la Revista, en su reunión de fecha 25/06/2008, Acordó: Que todo trabajo que haya sido evaluado y emitido su informe correspondiente de arbitraje, no podrá ser considerado para su publicación, si las correcciones del mismo no son devueltas en un lapso de dos meses posterior a la emisión del Informe del Editor. De insistir el autor sobre su publicación, el mismo deberá ser rearbitrado nuevamente para corroborar la actualidad de sus resultados.

La REVISTA CIENTIFICA FCV-LUZ, le invita a incluir anuncios de simposios, congresos, reuniones, talleres, conferencias, etc., nacionales o internacionales. Envíe la información 90 días antes del inicio de cada bimestre. Incluya por favor:

Fecha: \_\_\_\_\_ Lugar: \_\_\_\_\_

Evento: \_\_\_\_\_



Nuestra dirección: **Revista Científica**. Facultad de Ciencias Veterinarias.  
Universidad del Zulia. Núcleo Agropecuario. Ciudad Universitaria.  
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

correo electrónico: [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com)

<http://www.fcv.luz.edu.ve> - <http://www.scielo.org.ve> - <http://www.redalyc.org/> - <http://www.saber.ula.ve/>

**Esta información se editará y publicará sin cargo alguno**



UNIVERSIDAD DEL ZULIA  
**REVISTA CIENTÍFICA**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN



Estimado colega,

La Revista Científica (RCV) está aceptando artículos científicos para su publicación. La RCV publica artículos solicitados y no solicitados de alta calidad, en español e inglés, en todas las áreas de las Ciencias Veterinarias. Todos los artículos publicados en RCV serán revisados por árbitros cualificados.

Nuestro objetivo es informar a los autores de la decisión sobre su manuscrito en un plazo de ocho semanas de su entrega. Tras la aceptación de su artículo, el mismo será publicado en el número inmediatamente disponible.

Una de las herramientas clave para los investigadores a nivel mundial, es poder disponer de libre acceso a las publicaciones. Y dado que la Revista Científica de Veterinaria está plenamente comprometida con este objetivo, la misma posee el libre acceso a todos los artículos tan pronto como se publiquen y en su base de datos se encuentra desde el primer número editado en 1991.

Esa sí que en nombre del comité editor, le solicito su apoyo para que esta iniciativa continúe, mediante la publicación de sus documentos en esta revista.

Las instrucciones para autores y otras informaciones adicionales pueden ser consultadas en nuestra página web [www.fcv.luz.edu.ve](http://www.fcv.luz.edu.ve) Revista Científica. Aquellos autores interesados en publicar deberán enviar su manuscrito(s) al correo electrónico: [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com) o [revista@fcv.luz.edu.ve](mailto:revista@fcv.luz.edu.ve).

Saludos cordiales,

**Dr. Mario Pérez Barrientos**  
Editor Jefe  
Revista Científica de Veterinaria

✉ [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com)

🌐 [www.fcv.luz.edu.ve/](http://www.fcv.luz.edu.ve/)

[www.scielo.org.ve/](http://www.scielo.org.ve/) [www.redalyc.org/](http://www.redalyc.org/)

[www.saber.ula.ve/](http://www.saber.ula.ve/)





UNIVERSIDAD DEL ZULIA  
**REVISTA CIENTÍFICA**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN



Dear Colleague,

The Revista Científica (RCV) is currently accepting manuscripts for publication. RCV publishes high-quality solicited and unsolicited articles, in Spanish and English, in all areas of Veterinary Science. All articles published in RCV will be peer-reviewed.

Our objective is to inform authors of the decision on their manuscript within eight weeks of submission. Following acceptance, a paper will normally be published in the next available issue.

One key request of researchers across the world is open access to research publications. Revista Científica Veterinaria is fully committed to providing free access to all articles as soon as they are published. We ask you to support this initiative by publishing your papers in the journal.

Instruction for authors and other details are available on our website [www.fcv.luz.edu.ve](http://www.fcv.luz.edu.ve) Revista Científica. Prospective authors should send their manuscript(s) [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com) or [revista@fcv.luz.edu.ve](mailto:revista@fcv.luz.edu.ve)

Best regards,

**Dr. Mario Pérez Barrientos**  
Chif Editor  
Revista Científica de Veterinaria

✉ [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com)

🌐 [www.fcv.luz.edu.ve/](http://www.fcv.luz.edu.ve/)

[www.scielo.org.ve/](http://www.scielo.org.ve/) [www.redalyc.org/](http://www.redalyc.org/)

[www.saber.ula.ve/](http://www.saber.ula.ve/)

# INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La REVISTA CIENTÍFICA de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia es una revista internacional que recibe trabajos para publicación en las formas de artículos científicos originales no publicados, notas técnicas, cartas al editor y revisiones bibliográficas requeridas por el Comité Editorial. Como excepción a la condición de no publicado, podrán considerarse artículos que en forma completa o parcial hayan sido publicados en memorias de reuniones científicas de limitada circulación. Cualquier otra circunstancia debe ser explicada a la Oficina Editorial al momento del envío. Las cartas al editor deben contener comentarios útiles acerca de material publicado en la REVISTA CIENTÍFICA. La meta de publicar estas cartas es contribuir al intercambio constructivo de ideas y puntos de vista, con beneficios para la comunidad científica y para la REVISTA CIENTÍFICA. La aceptación de cartas al editor dependerá de la decisión del Comité Editorial.

Para publicaciones como artículos científicos, notas técnicas y cartas al editor se aceptan como lenguajes tanto el español como el inglés. Las revisiones bibliográficas serán escritas en el idioma inglés y no se aceptan más de dos autores, los cuales deben tener experiencia científica comprobada en el tópico propuesto. Sin embargo, trabajos extensos de edición para corregir lenguaje no se ofrece. Por tanto, los autores deben hacer revisar sus artículos por expertos con sólidos conocimientos de gramática, sintaxis y estilo de la escritura científica. El uso inapropiado del lenguaje puede conllevar al rechazo temporal de un artículo. Todos los artículos recibidos serán revisados en su forma y contenido por 3 expertos reconocidos usando el método del doble ciego.

Los artículos deben abordar aspectos relacionados a las áreas de la medicina veterinaria, producción animal y economía agropecuaria, salud pública vinculada a las ciencias veterinarias (zoonosis), tecnología de alimentos y vida silvestre. La aceptación de artículos que aborden cualquier otro tipo de tópicos relacionados será discutida por el Comité Editor. Aunque no de manera restringida, REVISTA CIENTÍFICA enfatiza en la publicación de información científica generada en zonas tropicales y subtropicales, o de aplicabilidad tropical. El contenido de los artículos debe representar una contribución significativa al cuerpo del conocimiento científico y debe reunir además los requerimientos siguientes:

- 1. Originales.** Los artículos deben ser enviados con una carta de acuerdo entre los autores. En esta carta, el autor responsable y los co-autores deben declarar que el artículo enviado no ha sido publicado previamente, así como su aprobación con respecto a la forma y contenido. La firma de todos los autores debe ser incluida. Los manuscritos deben ser escritos en letra Arial, tamaño 12 pts, a doble espacio y no más de 20 páginas, colocando en la primera página la información referente al título del trabajo (español, inglés), autores y la afiliación institucional, comenzando la segunda página con el resumen y abstract. Los cuatro márgenes serán de 2 cm. Todas las páginas deben estar numeradas consecutivamente y los números de línea deben ser impresos en cada página (empezando con 1 en cada página) para mayor facilidad de referencia para los revisores. Se recomienda enviar el artículo al correo electrónico [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com) en formato Word. Recomendamos usar ". Doc" en lugar de ". Docx", por posibles problemas de incompatibilidad. Las tablas, figuras y anexos deben incluirse en hojas separadas (pero en el mismo documento de Word), una por página. Si el artículo es aceptado, se anexaran las figuras y/o fotos de manera independiente. Los artículos deben ser inéditos y no haber sido enviados a otra revista. Todos los trabajos aceptados pasan a ser propiedad de la REVISTA CIENTÍFICA. Los artículos deben contener: Título y resumen (español e inglés), introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones e implicaciones, agradecimiento y referencias bibliográficas.
- 2. Título.** El título debe describir la esencia del artículo de manera clara y concisa, debiendo aparecer en español e inglés. Debe incluirse un título corto para ser usado como tope de página.
- 3. Autores.** Todos los autores deben ser listados por su nombre completo en el orden respectivo (nombres y apellidos) dejando un espacio debajo del título. Si trae dos apellidos deben separarse por un guión. El número de autores es ilimitado. Excepciones deben ser requeridas por escrito al Editor-Jefe por medio de una carta explicativa, especialmente cuando los autores pertenezcan a instituciones diferentes. La afiliación institucional de los autores debe ser señalada mediante numerales superíndices, y con un asterisco superíndice al autor para correspondencia. Seguido al asterisco superíndice, deberá indicarse teléfono, fax y/o dirección electrónica del autor para correspondencia. No se acepta colocar en los autores de cada referencia, los términos "y col" ó "et al". Deben colocarse todos los autores reales de un artículo.
- 4. Resumen.** En español e inglés con un máximo de 300 palabras y comenzando en la segunda página del manuscrito. Para un apropiado uso del lenguaje y estilo, se recomienda consultar con un experto.
- 5. Palabras clave.** Estas son necesarias para la ubicación del trabajo en índices internacionales y bases de datos. Incluir un máximo de 5, en español e inglés en el resumen y abstract, respectivamente. Deben ser separadas con punto y coma.
- 6. Tablas.** Deben citarse apropiadamente en el texto luego de ser nombradas, identificadas y enumeradas consecutivamente con números romanos. El encabezamiento debe ser conciso y descriptivo. Abreviaciones o símbolos deben ser explicadas al pie de la tabla. El encabezamiento debe ir sobre la tabla en mayúsculas, en español o inglés, dependiendo del idioma en que el trabajo fue escrito; no ambos simultáneamente. No se aceptan fotocopias. Las tablas deben. Haga las tablas tan simples como sea posible. Las tablas deben ser auto-explicativas con el encabezamiento y

notas al pie, permitiendo su comprensión sin necesidad de recurrir o referir el texto, no se aceptan referencias bibliográficas en las tablas.

- 7. Figuras.** Incluyen fotografías y gráficos. Las figuras deben citarse apropiadamente en el texto inmediato a su señalamiento, identificadas y enumeradas consecutivamente usando números arábigos. El encabezamiento debe ser conciso y descriptivo, debiendo colocarse debajo de la figura en mayúsculas, en español o inglés, dependiendo del idioma en que el trabajo fue escrito; no ambos simultáneamente. No se aceptan fotocopias. Las fotografías deben ser identificadas en el reverso con un número y una flecha indicando la orientación correcta. En los casos de microfotografías, debe indicarse la magnificación usada. Figuras a color son normalmente impresas en blanco y negro con la aprobación del autor.
- 8. Conclusiones:** Las mismas deben ser claras y precisas en ellas no se aceptan llamados a Referencias Bibliográficas
- 9. Agradecimiento.** Sólo se aceptan agradecimientos institucionales.
- 10. Referencias Bibliográficas.** Deben presentarse en una lista numerada y en estricto orden alfabético. Deben ser citadas en el texto (en orden cronológico) usando números arábigos entre corchetes. Estos números deben parearse con los de la lista de referencias bibliográficas. No se aceptan como referencias trabajos no publicados, artículos de periódicos o revistas populares ni comunicaciones personales. Evite el uso excesivo de literatura no arbitrada (e.g., libros, manuales, referencias electrónicas en exceso, etc.). No deben citarse resúmenes, a menos que sean la única referencia en relación a un aspecto importante. Los autores son responsables del uso correcto y presentación de las referencias. No se permiten citas bibliográficas en el Resumen, abstract ni en Conclusiones, en Tablas y Figuras. Los siguientes son ejemplos recomendados:

## Revistas:

- [1] MARQUEZ, E.J.; BARBOZA DE M., Y.; IZQUIERDO, P. Studies on the incorporation of bovine plasma in emulsion type of meat products. *J. Food Sci. Tech.* 34:337-339. 1997.
- [2] ALVAREZ, R.; VACCARO, L.; VACCARO, R.; VERDE, O.; RIOS, L.; MEJIAS, H. Estimation of weights of dual purpose calves from body measurements. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* IX (6): 502-507. 1999.

**Libros:** Deben señalarse, después de los autores, el título del tema consultado en el texto (no capítulo), seguido de En: o In: (dependiendo del idioma) y título del libro (en renegrido). Luego, los nombres de los editores, si los hay, finalizando con (Ed. o Eds.).

- [1] LEELAND, W.W. Steady state kinetics. In: *The Enzymes*. Boyer, P. (Ed.). 2nd Ed. Academic Press, New York. 66 pp. 1970.
- [2] LOOSE-MITCHELL, D.S.; STANCEL, G.M. Estrogens and progestagens. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman, J.G., Limbird, L.E.; Goodman-Gilman, A. (Eds.). 10th Ed. McGraw Hill, New York, Pp 1613-1651. 2002.

**Memorias:** Debe señalarse después del nombre del evento (en renegrido), el lugar, fecha de realización del mismo. Las páginas deben señalarse seguidas de pp.

- [1] EDDI, C. Distomatosis, epidemiological and economic aspects of this zoonosis. *Proc. Symposium on the Epidemiology of Foodborne Parasitic Zoonoses. P:A:H:O:W:HO Latin American Congress of Parasitology. I Uruguayan Congress of Parasitology.* Montevideo. 03/25-29. Uruguay: Pp 50-59 pp 1997.
- [2] FARIA, M.H.; TONHATI, H.; NADER-FILHO, A.; DUARTE, J.M.C. Milk production and some constituents in two buffalo herds in São Paulo State, Brazil. *Proceeding 5th World Buffalo Congress.* Caserta, 10/13-16. Pp 30-38. 1997.

**Referencias electrónicas:** No se aceptan referencias electrónicas a menos que sean trabajos arbitrados, boletines o comunicaciones respaldadas por instituciones científicas. Evite el uso excesivo de este tipo de referencias. En tales casos, estas referencias deben incluir: autor(es), título del trabajo, y el año del trabajo. Institución(es) que la respaldan. Luego se coloca: En Línea: o On Line: (dependiendo del idioma), seguido de la página web consultada, y finalmente, la fecha de consulta. Ejemplo:

- [1] FERNÁNDEZ, M.A. Manejo de la calidad de la dieta. 2005. La Mañana (Suplemento) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. En Línea: [http://www.lamañana.com.ar/html\\_01/12/2005](http://www.lamañana.com.ar/html_01/12/2005).

**MUY IMPORTANTE:** Cuando un trabajo sea devuelto a la Revista previamente corregido por los autores, no podrá ser sometido a corrección posterior a su publicación.

# GUIDE FOR AUTHORS

The REVISTA CIENTÍFICA from the Faculty of Veterinary Medicine, Universidad del Zulia is an international journal that receives submissions for publication in the form of original and unpublished manuscripts, technical notes, letters to the editor, and those review articles requested by the Editorial Board. Exceptions to the unpublished condition include the complete or partial publication in scientific meeting proceedings with limited circulation. Any other circumstance should be explained to the Editorial office at the moment of submission. The letters to the editor must contain useful comments on material published in the journal. It is the goal that publication of such letters may contribute to a constructive exchange of views with benefits to both the scientific community and the journal. Acceptance of submitted letters will depend upon decision of the Editorial.

For publications such as scientific papers, technical notes and letters to the editor are accepted as both languages Spanish and English. Literature reviews will be written in English and no more than two authors are accepted, whose must have scientific expertise in the proposed topic. Extensive editing to correct language is not available. Hence, authors should have their manuscripts reviewed by experts with solid knowledge on spelling, grammar, syntax and scientific writing style. Misused and inappropriate language may lead to temporal rejection of a manuscript. All submissions will be reviewed in their form and content by 3 recognized experts using the method of double blind.

Manuscripts must deal with aspects related to the fields of veterinary clinical sciences, animal production and agricultural economic, public health related to veterinary sciences, food technology related to animal products and wild life. Acceptance of manuscripts dealing with any other type of related topics will be discussed by the Editorial Board. Although not restricted to, REVISTA CIENTÍFICA emphasizes on publishing scientific information generated from tropical and subtropical zones or with tropical applicability. The content of manuscripts should add significant contribution to the body of scientific knowledge and must meet the following requirements:

- 1. Originals.** Manuscripts should be submitted together with an author agreement letter. In such letter, the responsible author and co-authors should declare the unpublished condition of the material and their agreement on the form and content of the manuscript. Signatures of all, the responsible author and co-authors should be included. Manuscripts should be written in Arial, 12-point font, with 2.0 spaced and not more than 20 pages, It should be sent by email to [revistafcv@gmail.com](mailto:revistafcv@gmail.com), placing on the first page the information about the title of the work (Spanish, English), authors and institutional affiliation, starting second page with abstract. The four margins will be 2.0 cm. All pages should be numbered consecutively, and line numbers should be printed on each page (starting with 1 on each page) to facilitate ease of reference for the reviewers. In Word format as a unique file; we encourage to use .doc files. It is recommended to submit rewritable CD in a single file, with tables, figures and annexes avoiding use of .docx files, for possible incompatibility problems. Separate figure files will be required if the manuscript is accepted. Tables, figures and appendices should be included on separate sheets (but in the same Word document), one per page if the article is accepted, figures and / or photos independently be annexed. Manuscripts should be in edit and not sent to any other journal. All accepted manuscripts become property of REVISTA CIENTÍFICA. Manuscripts must contain: Title, abstract (English-Spanish), introduction, materials and methods, results and discussion, conclusions and implications, acknowledgement, and bibliographic references.
- 2. Title.** The title should describe the essence of the manuscript in a very clear and concise manner. It should appear in both, English and Spanish. A short title to be used as a head page running title should be also included.
- 3. Authors.** Leaving a space below the title, all authors must be listed with full names in the respective order (first names and last names). List of authors is unlimited. Use superscript numbers to match institutional affiliation of authors and a superscript asterisk to identify the corresponding author. Matching the superscript numbers, the institutional affiliation and current address of all authors should be provided. Likewise, matching the asterisk symbol, telephone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author should be included.
- 4. Abstract.** In Spanish and English with a maximum of 300 words and starting on the second page of the manuscript. For an appropriate use of language and style, it is recommended to consult with an expert. Bibliographic references are not accepted.
- 5. Key words.** These are necessary for placement in international indexes and databases. Maximum of 5, in English and Spanish accordingly with abstracts, separated with dot and semicolon.
- 6. Tables.** These should be appropriately cited in the text and must be identified and consecutively numbered using Roman numerals. A concise and descriptive heading is requested. Abbreviations or symbols should be explained in a caption below the table. Title must be above the table in capital letters. Title should be presented in both, in Spanish or English, depending of the language in which the work was written, no simultaneously. Xerox copies will not be accepted. Keep tables as simple as possible. Tables are self-contained with the title and footnotes providing all information to understand the table without referring the text separated with semicolon. Tables should be included in the text immediately after mentioning them.

- 7. Figures.** These include both photographs and graphs. Figures should be appropriately cited in the text and identified and consecutively numbered using Arabic numerals. A concise and descriptive heading is requested. Title must be below the figure in capital letters. Title should be presented in both, in Spanish or English, depending of the language in which the work was written, no simultaneously. Xerox copies will not be accepted. Photographs should be identified on the back by number and an arrow indicating the correct orientation. When a microphotograph is used, the magnification used should be indicated. Photographs and Figures should be included in the text immediately after mentioned.
- 8. Acknowledgment.** Only institutional acknowledgments are allowed.
- 9. Conclusions:** Clear and precise. Bibliographic references are not accepted.
- 10. Bibliographic references.** These must be presented in a numbered list organized in a strict alphabetical order. References should be cited in the text in chronological order, using Arabic numbers between brackets. These numbers should be matched with the ones on the bibliographical references list. Unpublished works, newspaper or popular magazines articles, and personal communications are not accepted as references. Avoid the excessive use of non-peer reviewed material (e.g., books, handbooks). Abstract should not be cited unless it is the only available reference to an important concept. Authors are responsible for the correct use and presentation of Bibliographic cites, are not permitted in Abstract, Conclusions, Tables and Figures. The following are recommended examples:

## Journals:

- [1] MARQUEZ, E.J.; BARBOZA DE M., Y.; IZQUIERDO, P. Studies on the incorporation of bovine plasma in emulsion type of meat products. *J. Food Sci. Tech.* 34:337-339. 1997.
- [2] ALVAREZ, R.; VACCARO, L.; VACCARO, R.; VERDE, O.; RIOS, L.; MEJIAS, H. Estimation of weights of dual purpose calves from body measurements. *Rev. Cientif. FCV-LUZ.* IX (6): 502-507. 1999.

**Books:** After the authors should be included title of the consulted topic or theme in the book (no chapter) followed by In: and title of the book (in black letters). After that, the names of the Editors, if there are, followed by (Ed. or Eds.).

- [1] LEELAND, W.W. Steady state kinetics. In: *The Enzymes*. Boyer, P. (Ed.). 2nd Ed. Academic Press, New York. 66 pp. 1970.
- [2] LOOSE-MITCHELL, D.S.; STANCEL, G.M. Estrogens and progestagens. In: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman, J.G., Limbird, L.E.; Goodman-Gilman, A. (Eds.). 10th Ed. McGraw Hill, New York, Pp 1613-1651. 2002.

**Proceedings:** After the event name (in black letters) should be included the place, date and country of the event. The pages should be finalized with \*pp for total pages or Pp for consulted pages.

- [1] EDDI, C. Distomatosis, epidemiological and economic aspects of this zoonosis. *Proc. Symposium on the Epidemiology of Foodborne Parasitic Zoonoses. P:A:H:O:W:HO Latin American Congress of Parasitology. I Uruguayan Congress of Parasitology.* Montevideo. 03/25-29. Uruguay: Pp 50-59. 1997.
- [2] FARIA, M.H.; TONHATI, H.; NADER-FILHO, A.; DUARTE, J.M.C. Milk production and some constituents in two buffalo herds in São Paulo State, Brazil. *Proceeding 5th World Buffalo Congress.* Caserta, 10/13-16. Italy. 140 pp 1997.

**Electronic references:** Electronic references are not accepted unless these are peer reviewed manuscripts, bulletins or communications supported by scientific institutions. Avoid the excessive use of this type of references. For such cases, the on-line references must include: authors, title of the work, year of the work, institution that support the work. Later On Line: not under line followed by the consulted web and the complete consult date.

- [1] FERNÁNDEZ, M. A. Manejo de la calidad de la dieta. 2005. La Mañana (Suplemento) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Argentina. En Línea: [http://www.lamañana.com.ar/html\\_01/12/05](http://www.lamañana.com.ar/html_01/12/05)

**VERY IMPORTANT:** When a manuscript is returned to the Journal, previously corrected by the authors, it won't be able to be subjected to later corrections after publishing.

# SOLICITUD DE SUSCRIPCIÓN AÑO 2019

Favorendarme 1 año (6 números) de la REVISTA CIENTÍFICA

Coato Anual: Bs. 5.000,00

Depositar en la Cuenta Corriente 0105-0177-66-1177019582 del Banco Mercantil  
a nombre de: **UNIVERSIDAD DEL ZULIA**

Nombre: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Ciudad: \_\_\_\_\_ País: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_

Actividad: \_\_\_\_\_



## ORDER FORM YEAR 2019

Please send me 1 year (6 issues) of the REVISTA CIENTÍFICA

for US \$160.00 surface mail

Payment enclosed to: **UNIVERSIDAD DEL ZULIA**

Check No. \_\_\_\_\_ Bank: \_\_\_\_\_ Date: \_\_\_\_\_

Name(please print): \_\_\_\_\_

Addressed to: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ City: \_\_\_\_\_

State: \_\_\_\_\_ Zip Code: \_\_\_\_\_ Country: \_\_\_\_\_

Estampilla

REVISTA CIENTIFICA  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad del Zulia  
Ciudad Universitaria  
Núcleo Agropecuario.  
Apdo. 15252 Maracaibo 4005-A,  
Estado. Zulia - Venezuela  
Teléfono - Fax: (58-261)4126158  
E-mail: revistafcv@gmail.com  
<http://www.fcv.luz.edu.ve>  
<http://www.scielo.org.ve>  
<http://www.redalyc.org/>  
<http://www.saber.ula.ve/EstampillaStamp>  
<http://www.serbi.luz.edu.ve>  
<http://produccioncientifica.luz.edu.ve>  
<http://www.serbi.luz.edu.ve>  
<http://produccioncientifica.luz.edu.ve>

Stamp

REVISTA CIENTIFICA  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad del Zulia  
Ciudad Universitaria  
Núcleo Agropecuario.  
Apdo. 15252 Maracaibo 4005-A,  
Estado. Zulia - Venezuela  
Teléfono - Fax: (58-261)4126158  
E-mail: revistafcv@gmail.com  
<http://www.fcv.luz.edu.ve>  
<http://www.scielo.org.ve>  
<http://www.redalyc.org/>  
<http://www.saber.ula.ve/EstampillaStamp>  
<http://www.serbi.luz.edu.ve>  
<http://produccioncientifica.luz.edu.ve>  
<http://www.serbi.luz.edu.ve>  
<http://produccioncientifica.luz.edu.ve>

Hemos recibido el Vol. XXIX N° 3, 2019 de la REVISTA CIENTÍFICA  
Facultad de Ciencias Veterinarias - LUZ.

Nombre: \_\_\_\_\_

Institución: \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Telf: \_\_\_\_\_ Ciudad: \_\_\_\_\_ País: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Suscripción-Canje: \_\_\_\_\_

Por favor acuse recibido a fin de que la entrega no sea interrumpida.



We acknowledge the receipt of Vol. XXIX N° 3 2019 of REVISTA CIENTÍFICA  
Facultad de Ciencias Veterinarias - LUZ.

Name: \_\_\_\_\_

Institution: \_\_\_\_\_

Address: \_\_\_\_\_

Telph: \_\_\_\_\_ City: \_\_\_\_\_ Country: \_\_\_\_\_

Date: \_\_\_\_\_ Subscription-Exchange: \_\_\_\_\_

Plaase acknowledge the receipt, so that the remittance may not be interrupted.



UNIVERSIDAD DEL ZULIA

# REVISTA CIENTÍFICA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN  
Vol. XXIX (3), Mayo - Junio, 2019

<b>Index</b>	Pág.
<b><i>EDITORIAL</i></b>	163
<b><i>ANIMAL PRODUCTION</i></b>	
<b>EFFECT OF OAT SILAGE ON LACTATING COW IN NARIÑO-COLOMBIA</b> Juan Leonardo Cardona-Iglesias <sup>1*</sup> , Edwin Castro-Rincón <sup>2</sup> , Martín Valenzuela-Chiran <sup>3</sup> , Filadelfo Hernández-Oviedo <sup>4</sup> y Yesid Avellaneda-Avellaneda <sup>5</sup> .....	165
<b>GENETIC DIVERSITY AMONG LOCAL QUAIL USING RAPD-DNA MARKER</b> Lajan Salahaldin Ahmed* and Yousif Mohamed Salih AL-Barzinji.....	178
<b>TYPOGRAPHY AND GEOSPATIAL ANALYSIS THE SHEEP PRODUCTION IN THE MUNICIPALITY THE TUNAS, CUBA</b> Javier Antonio Herrera-Toscano <sup>1</sup> y Oscar Carmenate-Figueroa <sup>2</sup> .....	186
<b><i>VETERINARY MEDICINE</i></b>	
<b>SEROPREVALENCE OF BOVINE BRUCELLOSIS IN THE BOYACENSE HIGHLANDS, COLOMBIA - SOUTH AMERICA</b> Roy José Andrade-Becerra <sup>1*</sup> , Julio Cesar Vargas-Abella <sup>2</sup> , y Luis Edgar Tarazona-Manrique <sup>3</sup> .....	192
<b><i>WILD LIFE</i></b>	
<b>PREVALENCE OF THE MAJOR DISEASES IN <i>Penaeus vannamei</i> FARMED OF SINALOA, MEXICO</b> María Soledad Morales-Covarrubias <sup>1*</sup> , Noemí García-Aguilar <sup>1</sup> , María del Carmen Bolan-Mejía <sup>1</sup> and Oscar Guillermo Zamora-García <sup>2</sup> .....	198
<b>DIVERSIDAD BIOQUÍMICA DE LAS TOXINAS ACTIVAS Y EL ANÁLISIS PROTEÓMICO DEL VENENO DE LA SERPIENTE MAPANARE DE LANSBERG (<i>Porthidium lansbergii hutmanni</i>) Y SU IMPACTO EN EL ENVENENAMIENTO</b> María Eugenia Pineda <sup>1</sup> , Alba Marlene Vargas <sup>1</sup> and Alexis Rodríguez-Acosta <sup>2*</sup> .....	207
<b>POPULATION PARAMETERS OF THE CRAB <i>Callinectes danae</i> (DECAPODA: PORTUNIDAE) FROM LA ISLETA, MARGARITA ISLAND, VENEZUELA</b> Nora Eslava <sup>1</sup> , Leo Walter González <sup>1</sup> , Francisco Guevara <sup>1</sup> y Idar Quijada <sup>2</sup> .....	221
<b><i>VETERINARY PUBLIC HEALTH</i></b>	
<b>ECOEPIDEMIOLOGICAL FACTORS RELATED TO SEROPREVALENCE OF ANTI-Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi ANTIBODIES IN AUTOCHTHONOUS INHABITANTS OF COMMUNITIES FROM MARGARITA ISLAND, NUEVA ESPARTA STATE, VENEZUELA.</b> Antonio Morocoima <sup>1</sup> , Oriana Carías-Sojo <sup>1</sup> , Elizabeth Ferrer <sup>2</sup> , Leonardo De Sousa <sup>3</sup> y Servio Urdaneta-Morales <sup>4</sup> .....	231



UNIVERSIDAD DEL ZULIA

# REVISTA CIENTÍFICA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN  
Vol. XXIX (3), Mayo - Junio, 2019

## Índice

Pág.

### **EDITORIAL**

163

### **PRODUCCIÓN ANIMAL**

EFFECTO DEL ENSILAJE DE AVENA SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE VACAS LACTANTES EN NARIÑO-COLOMBIA

Juan Leonardo Cardona-Iglesias<sup>1\*</sup>, Edwin Castro-Rincón<sup>2</sup>, Martín Valenzuela-Chiran<sup>3</sup>, Filadelfo Hernández-Oviedo<sup>4</sup> y Yesid Avellaneda-Avellaneda<sup>5</sup>.....

165

DIVERSIDAD GENETIC ENTRE CODORNICES LOCALES USANDO MARCADORES DNA-RAPD

Lajan Salahaldin Ahmed\* and Yousif Mohamed Salih AL-Barzinji.....

178

TIPOLOGÍAS Y ANÁLISIS GEOESPACIAL DE LA PRODUCCIÓN DE OVINOS EN EL MUNICIPIO LAS TUNAS, CUBA

Javier Antonio Herrera-Toscano<sup>1</sup> y Oscar Carmenate-Figueroa<sup>2</sup>.....

186

### **MEDICINA VETERINARIA**

SEROPREVALENCIA DE BRUCELOSIS BOVINA EN EL ALTIPLANO BOYACENSE, COLOMBIA-SURAMÉRICA

Roy José Andrade-Becerra<sup>1\*</sup>, Julio Cesar Vargas-Abella<sup>2</sup>, y Luis Edgar Tarazona-Manrique<sup>3</sup>.....

192

### **FAUNA SILVESTRE**

PREVALENCIA DE LAS PRINCIPALES ENFERMEDADES EN *Penaeus vannamei* DE CULTIVO EN SINALOA, MEXICO

María Soledad Morales-Covarrubias<sup>1\*</sup>, Noemí García-Aguilar<sup>1</sup>, María del Carmen Bolan-Mejía<sup>1</sup> and Oscar Guillermo Zamora-García<sup>2</sup>.....

198

BIODIVERSITY OF ACTIVE TOXINS AND PROTEOMIC ANALYSIS OF LANSBERG'S MAPANARE (*Portulidium lansbergii hutmanni*) VENOM SNAKE AND ITS IMPACT ON ENVENOMING

María Eugenia Pineda<sup>1</sup>, Alba Marlene Vargas<sup>1</sup> and Alexis Rodríguez-Acosta<sup>2\*</sup>.....

207

PARÁMETROS POBLACIONALES DEL CANGREJO *Callinectes danae* (DECAPODA: PORTUNIDAE) DE LA ISLETA, ISLA DE MARGARITA; VENEZUELA

Nora Eslava<sup>1</sup>, Leo Walter González<sup>1</sup>, Francisco Guevara<sup>1</sup> y Idar Quijada<sup>2</sup>.....

221

### **SALUD PÚBLICA VETERINARIA**

FACTORES ECOEPIDEMIOLOGICOS RELACIONADOS CON LA SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-*Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* EN HABITANTES AUTÓCTONOS DE COMUNIDADES DE ISLA MARGARITA, ESTADO NUEVA ESPARTA, VENEZUELA.

Antonio Morocoima<sup>1</sup>, Oriana Carías-Sojo<sup>1</sup>, Elizabeth Ferrer<sup>2</sup>, Leonardo De Sousa<sup>3</sup> y Servio Urdaneta-Morales<sup>4</sup>.....

231