

CAPÍTULO 3.1.21.

SURRA EN TODAS LAS ESPECIES (INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA EVANSI*)

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: *Trypanosoma evansi* causa una tripanosomosis denominada 'surra'. Afecta a un gran número de especies animales salvajes y domésticas de África, Asia, Centroamérica y Sudamérica. La especie hospedadora principal varía según el área geográfica, pero en particular el camello, el caballo, el búfalo y el ganado bovino, resultan ser los más afectados, aunque también hay otros animales susceptibles, incluidos los perros, los gatos y especies salvajes. Es una enfermedad transmitida por artrópodos; varias especies de moscas hematófagas, como las de la familia Tabanidae o Stomoxidae, intervienen en la transmisión de la infección entre hospedadores, actuando como vectores mecánicos. En Brasil, los vampiros también intervienen y constituyen un tipo peculiar de transmisión biológica. En los carnívoros, la principal vía de transmisión es la oral.

Los signos clínicos generales de las infecciones causadas por *T. evansi* son los siguientes: la pirexia directamente asociada a la parasitemia, junto con una anemia progresiva, una pérdida de la condición corporal y lasitud, que no son lo suficientemente patognomónicos como para establecer el diagnóstico. Durante el curso de la enfermedad, se producen episodios recurrentes de fiebre y parasitemia. En los caballos, a veces se observa edema, en concreto en las partes inferiores del cuerpo, placas de urticaria y hemorragias petequiales en las serosas. Se han descrito abortos en los búfalos de agua y los camellos. En los caballos y los perros son frecuentes los signos nerviosos. Esta enfermedad causa inmunodeficiencias que podrían tener un gran impacto si interfieren con otras enfermedades o campañas de vacunación (como la fiebre aftosa o la septicemia hemorrágica).

Detección del agente: Se requieren métodos de laboratorio para detectar al agente patógeno. En la infección temprana y en los casos agudos, cuando la parasitemia es alta, el examen de extensiones de sangre fresca, de frotis teñidos o de preparaciones de ganglio linfático podría poner de manifiesto los tripanosomas. En los casos más crónicos, o más generalmente cuando la parasitemia es baja, es necesario optar por el examen de gotas gruesas, así como por los métodos de concentración del parásito y la inoculación de roedores de laboratorio. En los portadores aparentemente sanos (animales sin signos clínicos), casi nunca se observan parásitos, y la inoculación de ratones es la técnica que da los mejores resultados. Se dispone de varios pares de cebadores dirigidos al subgénero (*Trypanozoon*) o a las secuencias de ADN parasitarias específicas de especie (*T. evansi*) para el diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es más sensible que el examen parasitológico, pero podría dar falsos negativos cuando la parasitemia es muy baja; en estos casos, los portadores sospechosos solo pueden confirmarse mediante examen serológico.

Pruebas serológicas: La infección provoca respuestas de anticuerpos específicos y se han introducido diversas pruebas de detección de anticuerpos para su utilización en el laboratorio y en el campo. Algunas se han validado en parte, pero aún están pendientes de evaluación y normalización a gran escala. Las más destacadas son la prueba de la inmunofluorescencia (FAT), los enzoinmunoanálisis (ELISA) y la prueba de la aglutinación en tarjeta (CATT/*T. evansi*). Para la utilización en el campo, solo puede aplicarse la CATT/*T. evansi*. Actualmente no se dispone de pruebas de diagnóstico rápidas (RDT). Las estimaciones de los valores predictivos indican que el ELISA para la detección de la IgG es más probable que clasifique correctamente los animales no infectados, mientras que la CATT es más probable que clasifique correctamente los animales verdaderamente infectados. Así pues, ELISA sería adecuado para verificar que los animales están libres de la enfermedad, útil antes de los desplazamientos o durante las cuarentenas. La CATT

puede utilizarse para detectar animales determinados con el fin de tratarlos con fármacos tripanocidas. Para declarar un estado de ausencia de enfermedad, se recomienda realizar un análisis seriado – CATT y ELISA seguidos de un nuevo análisis de las muestras sospechosas –se recomienda asociarlos a una PCR. En las zonas donde se encuentra *T. cruzi*, *T. equiperdum* o tripanosomas transmitidos por la mosca tse-tsé, pueden producirse reacciones cruzadas en cualquier prueba serológica que se utilice.

Requisitos para las vacunas: No existen vacunas para esta enfermedad.

A. INTRODUCCIÓN

La infección por *Trypanosoma evansi* (subgénero *Trypanozoon*) causa una enfermedad denominada surra en la India (principalmente en caballos y bóvidos), también conocida, entre otras denominaciones, como El Debab, El Gafar, Tabourit o MBori en el Norte de África (sobre todo en camellos), o y Mal de Caderas o Murrina en Latinoamérica (en caballos). Los signos clínicos de la surra son indicativos pero no suficientemente patognomónicos, de modo que el diagnóstico debe confirmarse mediante pruebas de laboratorio.

En los animales susceptibles, que son los camellos (dromedarios y bactrianos), los caballos, los búfalos de agua, el ganado bovino, las ovejas, las cabras, los cerdos, los ciervos, los perros y los gatos la enfermedad se manifiesta con fiebre, asociada directamente a la parasitemia, junto con anemia progresiva, pérdida de la condición corporal y lasitud. Estos episodios recurrentes conllevan una fiebre intermitente (de incluso 44°C en los caballos [Gill, 1977]) y parasitemia durante el curso de la enfermedad. A veces se observa edema, en concreto en las partes inferiores del cuerpo, un pelaje áspero en los camellos y placas de urticaria y hemorragias petequiales en las mucosas de équidos machos, y un edema de los genitales puede ser un signo clínico que puede confundirse con la durina. En los casos avanzados, los parásitos invaden el sistema nervioso central (SNC), lo cual puede conllevar signos neurológicos (parálisis progresiva de los cuartos traseros y, en ocasiones infrecuentes, paraplejía), sobre todo en los caballos, pero también en otras especies hospedadoras antes de la postración total y la muerte. Se han observado abortos en búfalos y camellos (Gutiérrez et al., 2005; Lohr et al., 1986) y existen indicios claros de que la enfermedad causa inmunodeficiencia (Desquesnes et al., 2013a).

Hay una variación considerable entre las distintas cepas en lo que respecta a la patogenicidad, y entre las distintas especies hospedadoras en lo que respecta a la susceptibilidad. La enfermedad se puede manifestar de forma aguda o crónica y, en el último caso, puede persistir durante varios meses, y posiblemente durante años. La enfermedad suele ser rápidamente mortal en los camellos, los caballos y los perros. También puede ser mortal en los búfalos de agua, el ganado bovino, ovino, caprino, porcino y las llamas, aunque estas especies hospedadoras, así como los camellos, pueden desarrollar infecciones leves o subclínicas. Los animales salvajes, como el ciervo, el capibara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) o el coatí (*Nasua nasua*) pueden resultar infectados y enfermar (e incluso morir), pero también pueden recuperarse y constituir un reservorio. Los animales sometidos a estrés – malnutrición, gestación o trabajo – son más susceptibles a la infección.

Biológicamente, *T. evansi* es muy similar a *T. equiperdum*, el agente causal de la durina, y morfológicamente se parece a las formas esbeltas de las subespecies transmitidas por la mosca tse-tsé, *T. brucei* *brucei*, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*. La mayor parte de las caracterizaciones indica que distintas cepas de *T. evansi* aisladas en Asia, África y Sudamérica son muy homogéneas y podrían tener un origen común (Ventura et al., 2002), pero otros trabajos sugieren que *T. evansi* podría haber emergido de *T. brucei* en varios casos (Jensen et al., 2008; Lai et al., 2008). El análisis de cepas de *T. evansi* y de *T. equiperdum* mediante amplificación aleatoria de ADN polimórfico e identificación genética con endonucleasas mostró que forman un grupo estrechamente relacionado y muy homogéneo. Se han destacado las dificultades en la diferenciación de *T. equiperdum* respecto a las otras especies de *Trypanozoon* (Zablotskij et al., 2003), y la existencia de *T. equiperdum* incluso se ha cuestionado.

Cuando *T. evansi* evolucionó a partir de *T. brucei*, su ADN cinetoplástico se vio sometido a alteraciones o pérdida, total o parcial; como consecuencia, ya no puede llevar a cabo un ciclo en las moscas tse-tsé (Lai et al., 2008), y se transmite principalmente por medios mecánicos por moscas hematófagas. De hecho, *T. evansi* se consideró una malignidad de *T. brucei* (Lun et al., 2015). Los principales vectores mecánicos de *T. evansi* son los tábanos (entre los que predominan *Tabanus*, *Chrysops* y *Haematopota*) y las moscas *Stomoxys* (*Stomoxys* spp., *Hematobia* sp., etc); son responsables de la transmisión inmediata a corta distancia entre los animales que viven, pastan o beben agua juntos. Los gatos y los perros no parecen jugar un papel significativo en la transmisión continua de la

enfermedad, pero generalmente actúan como animales centinela. Al igual que otros miembros del subgénero *Trypanozoon*, *T. evansi* es capaz de penetrar a través de las mucosas, lo que permite no solo la transmisión vertical en el útero, sino también la transmisión por vía oral, principalmente observada en carnívoros domésticos y salvajes, y murciélagos vampiro de Latinoamérica, pero también puede ser responsable de la transmisión materno-fetal en el parto. Debido a los picos frecuentes de parasitemia, también se debe considerar el riesgo de transmisión iatrogénica cuando se aplican tratamientos en serie (Desquesnes et al., 2013b).

En Latinoamérica, *T. evansi* ha encontrado un vector vertebrado: el murciélago vampiro, como por ejemplo, *Desmodus rotundus*. Estos mamíferos hematófagos se infectan cuando se alimentan de hospedadores como caballos o ganado bovino infectados, desarrollan la infección y pueden recuperarse y permanecer bajo una infección crónica; durante este período, los tripanosomas invaden las glándulas salivales. Luego pueden transmitir *T. evansi* cuando pican a sus congéneres de la colonia de murciélagos y al ganado bovino cuando se alimenta; por lo tanto, los murciélagos vampiros son a la vez hospedadores, reservorios y vectores del parásito. Varios mamíferos silvestres actúan como posibles reservorios de *T. evansi* en Latinoamérica, siendo el capibara, que es el roedor más grande del mundo, el centinela más importante para detectar la presencia de surra, ya que niveles significativos de parasitemia no están asociados a un impacto clínico (Desquesnes et al., 2013a; 2013b).

Como todos los tripanosomas patógenos, *T. evansi* está recubierto por una densa capa proteica formada por una única proteína denominada glucoproteína variante de superficie (VSG). Esta actúa como el inmunógeno principal e induce la formación de una serie de anticuerpos específicos. Los parásitos son capaces de evitar las consecuencias de estas reacciones inmunitarias cambiando la VSG, fenómeno que se conoce como variación antigénica.

La surra debe tenerse en cuenta en el diagnóstico diferencial cuando a nivel de campo se hallan casos que se inician con fiebre y/o anemia. La anemia suele ser un indicador fiable de infección por tripanosomas, pero no es por sí misma patognomónica. Por otra parte, los animales con una infección subclínica leve pueden presentar parasitemia sin signos de anemia. Para un diagnóstico fiable es necesaria la confirmación de la infección con técnicas de laboratorio.

En las zonas enzoóticas, el diagnóstico sistemático puede llevarse a cabo utilizando técnicas parasitológicas, mientras que los estudios serológicos pueden realizarse preferiblemente mediante ELISA. La prueba de la aglutinación con tarjeta (CATT)/*T. evansi* puede utilizarse para detectar animales individualmente con el fin de tratarlos con fármacos tripanocidas.

Cuando es necesaria una confirmación definitiva de la ausencia de infección (por ejemplo, para la importación a zonas libres de la enfermedad), se requieren pruebas seriadas, que incluyan un ELISA de detección de anticuerpos y un método sensible de detección del agente patógeno, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La inoculación de ratones debe restringirse solo a los casos estrictamente justificados.

En las zonas donde se encuentra *T. cruzi*, *T. equiperdum* o tripanosomas transmitidos por la mosca tse-tsé, pueden producirse reacciones cruzadas con cualquier prueba serológica que se utilice, de tal forma que pueda establecerse por completo el estatus exacto respecto a la tripanosomosis.

La surra no se conoce como enfermedad zoonótica, sin embargo, se han descrito algunos casos humanos muy infrecuentes, especialmente en India y Vietnam (Van Vinh Chau et al., 2016). En consecuencia, las muestras de animales sospechosos deben manipularse a un nivel de bioseguridad y biocontención apropiado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico, como se describe en el Capítulo 1.1.4 Bioseguridad y bioseguridad: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y las instalaciones para animales.

Como no existe una vacuna contra la tripanosomosis, la única opción es el tratamiento de los animales con fármacos tripanocidas; la OIE ha publicado un artículo que establece métodos de control de la calidad para los medicamentos tripanocidas:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25812206> o

<http://boutique.oie.int/extrait/091209201400040ensutcliffe813830.pdf>

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Existen varias de pruebas de diagnóstico y los investigadores siguen trabajando para mejorar las mismas y desarrollar otras nuevas. Las pruebas de diagnóstico actuales varían en cuanto a sensibilidad y especificidad, la facilidad con la que se pueden aplicar y sus costos. La elección de una prueba en particular dependerá de cuestiones económicas, de la experiencia y, especialmente, de los requisitos del diagnóstico. Por ejemplo, se requieren diferentes grados de sensibilidad y especificidad para confirmar la infección en un animal individual que para detectarla a nivel del rebaño. Asimismo, las pruebas de diagnóstico para establecer la prevalencia parasitológica de la tripanosomosis son diferentes de las requeridas para establecer la presencia o ausencia de la enfermedad en un área. Se puede lograr un diagnóstico fiable combinando las pruebas de diagnóstico adecuadas. La fiabilidad en la interpretación de los resultados de las pruebas de diagnóstico dependerá de la validez de la prueba, así como de si la selección/obtención de la muestra ha sido adecuada, del tamaño de la muestra y de la forma en que se realicen las pruebas de diagnóstico (véase la Tabla 1). Las técnicas de diagnóstico (incluidas las figuras) para la mayoría de las pruebas descritas en el apartado B se pueden consultar en detalle en el “Compendio de protocolos de diagnóstico estándar para tripanosomosis animales de origen africano”, disponible en línea:

<https://www.woah.org/en/document/compendium-of-diagnostic-protocols-of-the-oie-reference-laboratory-for-animal-trypanosomoses-of-african-origin/>

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
GSBS fino (o linfa o líquido edematoso)	-	+	+	+++	++	-
Detección de ADN/PCR	+++	+++	+++	+++	+++	-
Frotis sanguíneo húmedo	-	-	-	++	-	-
TGSBF	-	-	-	++	++	-
HCT (Woo)	+++	+++	+++	+++	+++	-
BCT (Murray)	+	+	++	++	++	-
AECT	-	+	++	++	-	-
Detección de respuesta inmunitaria						
CATT/ <i>T. evansi</i>	++	++	+++	+++	++	-
IFAT <i>T. evansi</i>	++	+++	+++	+++	++	-

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
ELISA <i>T. evansi</i>	+++	+++	+++	+++	+++	-
Prueba TL RoTat1.2	-	-	++	-	+	-

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero con limitaciones; + = puede utilizarse pero en muy pocas circunstancias; - = no adecuado para este propósito.

GSBS = frotis de sangre teñido con Giemsa; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; TGSBF = extensión gruesa de sangre teñida con Giemsa; HCT = técnica de centrifugación para hematocrito; BCT = técnica de capa leucocitaria; AECT = técnica de cromatografía con intercambio aniónico; CATT = prueba de aglutinación con tarjeta; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoimmunoanálisis; TL = prueba de la tripanolisis.

^(a)Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en una misma muestra clínica (véase el apartado B.3.2).

1. Detección del agente

Los métodos parasitológicos directos clásicos para el diagnóstico de la tripanosomosis, es decir, el examen microscópico de sangre o de tejido de ganglio linfático, no son muy sensibles, pero existen varias técnicas, como el enriquecimiento de la muestra, la inoculación en roedores o los métodos basados en el ADN que pueden aumentar dicha sensibilidad. En las zonas donde puede haber otras especies de *Trypanozoon* además de *T. evansi*, la discriminación específica de especie requiere métodos moleculares y no puede llevarse a cabo mediante exámenes por microscopía.

1.1. Examen microscópico directo

1.1.1. Extracción de la muestra de sangre

Trypanosoma evansi es un parásito de la sangre y los tejidos. Del mismo modo que para otros tripanosomas, se recomienda que la sangre para el diagnóstico se extraiga de la vena periférica de la oreja o de la vena coccígea, aunque normalmente es preferible la vena yugular por razones prácticas. Sin embargo, es preciso saber que, mediante el examen de la sangre, se pueden identificar menos del 50% de los animales infectados.

La sangre periférica se obtiene por punción de una pequeña vena de la oreja o de la cola. Las muestras más profundas se toman de una vena más grande con una jeringuilla. Primero se limpia con alcohol un área marginal de la oreja o de la punta de la cola y, cuando está seca, se pincha con un instrumento adecuado (lanceta, aguja). Debe garantizarse que los instrumentos estén esterilizados, o bien utilizar instrumental desechable, con el fin de evitar la transmisión iatrogénica de la infección por sangre residual.

1.1.2. Extensiones de sangre húmedas

Se deposita sobre un porta de vidrio limpio una pequeña gota de sangre (2–3 µl) y se coloca encima un cubre para extender la sangre como si fuera una monocapa de células. Esta se examina por microscopía óptica (×200) para detectar posibles tripanosomas móviles. Puede mejorarse la visualización utilizando la microscopía de campo oscuro o de contraste de fases (200–400 ×). La sensibilidad de este método es baja, de unos 10 tripanosomas por µl, lo cual solo es frecuente en las infecciones tempranas o agudas. Este examen se puede aplicar a la confirmación de casos, no obstante, debido a su escasísima sensibilidad, se utiliza sobre todo para el seguimiento de animales infectados de forma experimental.

1.1.3. Extensión gruesa de sangre teñida con Giemsa (TGSBF)

En el centro de un porta para microscopía se deposita una gota grande de sangre (10 μ l) y se extiende con un palillo o con el borde de otro porta hasta cubrir un área aproximada de 1,0–1,25 cm de diámetro. Se deja secar durante al menos 1 hora protegiendo la preparación de los insectos. Se coloca el porta en posición horizontal, se tiñe el frotis no fijado con tinción de Giemsa (una gota de solución comercial de Giemsa + 1 ml de solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2), durante 25 minutos. Una vez lavados y secados, se examinan los frotis mediante microscopía óptica a 500 aumentos con aceite de inmersión. La ventaja de la técnica de la gota gruesa es que concentra la gota de sangre en un área pequeña, de modo que se requiere menos tiempo para detectar los parásitos, que son más visibles debido a la hemólisis de los eritrocitos no fijados. La desventaja es que se pueden dañar los parásitos durante el proceso, y el método no es, por tanto, adecuado para la identificación de especies en el caso de las infecciones que puedan ser mixtas. En consecuencia, los frotis de sangre en general son preferibles a las extensiones gruesas de sangre.

1.1.4. Frotis de sangre teñidos con Giemsa (GSBS)

Se coloca una pequeña gota de sangre (3–5 μ l) en un extremo de un porta limpio para microscopía y se prepara una extensión fina del modo habitual. La extensión se seca brevemente al aire, se fija durante 1 minuto con alcohol metílico y se deja secar. Luego los frotis se tiñen 25 minutos con Giemsa (una gota de Giemsa + 1 ml de PBS, pH 7,2). Esta preparación se escurre, se lava con agua del grifo y se seca. Hoy en día, las tinciones rápidas comerciales son las más utilizadas, las cuales permiten fijar y teñir en pocos segundos. A continuación, los portas se lavan con agua del grifo y se secan. Se examinan a 400-1000 aumentos con aceite de inmersión. Esta técnica permite realizar estudios morfológicos detallados y la identificación del subgénero *Trypanozoon* (lo cual, a veces, permite la definición de especie, según el contexto epizootiológico), pero tiene una escasísima sensibilidad (solo permite detectar parasitemia si hay >500 000 tripanosomas/ml de sangre). No obstante, cuando el resultado es positivo, este examen da una confirmación de la infección fiable y específica de subgénero.

1.1.5. Biopsias de ganglio linfático o líquido edematoso

Normalmente, las muestras se extraen de los ganglios linfáticos pre-escapulares o pre-cruales (subilíacos), preferiblemente cuando presentan linfadenomegalia. Se selecciona mediante palpación un ganglio adecuado y se limpia la zona con alcohol. El ganglio se pincha con una aguja del calibre adecuado y se aspira material del ganglio linfático hacia el interior de la jeringuilla. Este material se expone sobre un porta, se tapa con un cubre y se examina como en las preparaciones de sangre fresca. También se pueden guardar gotas gruesas o finas fijadas para un examen posterior. Se puede llevar a cabo un examen similar mediante la extracción de líquido edematoso.

1.2. Métodos de concentración

En la mayoría de sus hospedadores, *T. evansi* puede inducir infecciones clínicas leves o un estado subclínico de portador con baja parasitemia en el que resulta difícil poner de manifiesto la presencia de los parásitos. En estas circunstancias, son necesarios métodos de concentración, puesto que estos aumentan la sensibilidad del examen microscópico; al basarse en la observación de parásitos en movimiento, la ejecución de estos métodos no puede tener lugar más allá de 2-4 horas tras la extracción de la sangre.

1.2.1. Técnica de la centrifugación del hematocrito (también denominada técnica de Woo, o HCT)

Se extrae sangre (2 x 70 μ l) y se coloca en dos tubos capilares heparinizados (75 x 1,5 mm). Se obtura el extremo húmedo con plastilina y se centrifugan a 14 000 *g* durante 5 minutos (en general, 12.000 rpm en una centrífuga de hematocrito). Se examina el tubo capilar y el hematocrito se expresa como porcentaje del concentrado de células hemáticas respecto al volumen total de sangre (% del volumen de células concentradas); este es un dato indicativo de la anemia del animal. A continuación, el tubo capilar se sitúa en un surco creado con trozos de porta pegado a un portaobjetos, para la observación microscópica. Los tripanosomas son las células grandes que se concentran en la unión entre la capa leucocitaria y el plasma, que es

observable al microscopio (100-200×). Deben ajustarse las condiciones de luz para inducir la refringencia de las células, con el fin de aumentar la visibilidad de los tripanosomas en movimiento; esto se puede conseguir bajando el condensador o con posiciones intermedias del condensador de torreta. Se pueden obtener cámaras de lectura especialmente diseñadas para el HCT en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Surra¹; permiten sumergir el tubo capilar en agua para evitar la difracción de la luz, sin embargo, requieren objetivos focales largos. Cuanto más fresca sea la muestra, mejor será la sensibilidad, ya que los fuertes movimientos parasitarios hacen que los tripanosomas sean más visibles. Esta técnica puede detectar alrededor de 50–200 tripanosomas/ml de sangre (Desquesnes, 2004). La muestra de capa leucocitaria también se puede extraer del tubo capilar para prepararla para la HCT; es la más empleada y una de las mejores técnicas de concentración para la detección de *T. evansi*; su especificidad se limita al nivel de subgénero (*Trypanozoon* frente a *Duttonella*, *Nannomonas*, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum*).

1.2.2. Técnica de la capa leucocitaria (también denominada técnica de Murray, o BCM)

Esta técnica es muy similar a la anterior. Se extrae la sangre introduciéndola en tubos capilares con heparina y se centrifuga como se indica más arriba. El tubo se marca con un lápiz de diamante de corte y se rompe 0,5 mm por debajo de la capa leucocitaria, de modo que la parte de arriba contiene una pequeña capa superior de eritrocitos, la capa leucocitaria (leucocitos y plaquetas) y algo de plasma.

Se expulsa el contenido de esta pieza sobre un porta; se debe evitar expulsar más de 5–8 µl de plasma, pero asegurando que la capa leucocitaria haya sido expulsada (el pequeño disco de capa leucocitaria debe ser visible a simple vista), se presiona con un cubreobjetos para esparcir la capa leucocitaria y se examina con fondo oscuro, contraste de fases u otra técnica de microscopía similar en las condiciones de refringencia previamente descritas, a 200–500 aumentos. Se observan tripanosomas principalmente en la periferia del material denso de la capa leucocitaria. Eliminar la capa leucocitaria del tubo capilar es un paso delicado y afectará la reproducibilidad de la técnica. El HCT (apartado B.1.2.1 anterior) es más aconsejable que el BCT, ya que este último depende en gran medida de la habilidad técnica del operario y presenta un bajo nivel de reproducibilidad.

Tanto la técnica de Woo como la de Murray permiten realizar una estimación de la anemia midiendo el hematocrito, y pueden utilizarse en estudios de rebaños que se encuentren en riesgo. El valor del hematocrito (considerado como bajo cuando es por ejemplo <24% en ganado bovino) se puede utilizar como indicador para escoger un subgrupo de muestras que se enviarán para realizar un análisis mediante PCR, más cara pero también más sensible (Desquesnes et al., 1999).

1.2.3. Técnica de cromatografía con intercambio aniónico

Cuando se pasa una muestra de sangre de animales infectados con tripanosomas salivales por una columna de intercambio aniónico de DEAE-celulosa (dietilamino-etilcelulosa, como la GE Healthcare) adecuada, las células sanguíneas del hospedador, al estar cargadas más negativamente que los tripanosomas, pueden adsorberse al intercambiador aniónico (en unas condiciones de pH y de potencia iónica adaptadas según la especie hospedadora), mientras se eluyen los tripanosomas, conservando viabilidad e infectividad (Lanham & Godfrey, 1970). Esta técnica se utiliza principalmente para la purificación de parásitos en muestras de sangre (por ejemplo, para la preparación del antígeno del parásito), pero se han desarrollado sistemas en miniatura, sobre todo para el diagnóstico en humanos. La sensibilidad de esta técnica puede aumentarse aproximadamente diez veces cuando se utilizan preparaciones de capa leucocitaria en vez de sangre total.

i) Preparación de solución salina de glucosa tamponada (PSG), pH 8

Na₂HPO₄ anhidro (13,48 g); NaH₂PO₄·2H₂O (0,78 g); NaCl (4,25 g); agua destilada (1 litro).
Las soluciones de diferente fuerza iónica se hacen diluyendo el PBS original, a pH 8, y

1 Puede consultarse la página web de la OIE:
<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>

añadiendo glucosa para mantener una concentración adecuada. Para la sangre de ratón, de rumiantes salvajes y domésticos, y de perro, se añaden cuatro partes de PBS a seis partes de agua destilada y se ajusta la concentración final de glucosa al 1%. Para la sangre de cerdos o conejos, se añaden tres partes de PBS a siete partes de agua destilada y se ajusta la concentración final de glucosa al 1,5%. La solución de PBS/glucosa (PSG) debe ser estéril (pero la PBS debe esterilizarse en autoclave antes de añadir la glucosa).

ii) *Equilibrado de la matriz de DEAE-celulosa*

Se suspenden 500 g de DEAE-celulosa en 2 litros de agua destilada. Se mezcla durante 20 minutos con un agitador magnético recubierto de plástico a baja velocidad (se prescribe el contacto metálico con DEAE-celulosa). Se ajusta el pH a 8 con ácido fosfórico. Se deja reposar durante 30 minutos. Se elimina el sobrenadante, que contiene las partículas más finas que podrían bloquear la columna. Se repite el proceso tres veces usando tampón PSG como se describe arriba. Se guarda la suspensión concentrada equilibrada de DEAE-celulosa (gel) a 4°C si el periodo de almacenaje va a ser corto, o bien a -20°C si debe conservarse durante más tiempo.

iii) *Montaje de la matriz de DEAE-celulosa equilibrada*

Se coloca una jeringuilla de 2 ml sin émbolo sobre una rejilla de tubos de ensayo completa con un tubo flexible que puede cerrarse con una pinza para que actúe como grifo. Se pone un disco de papel de filtro de Whatman n° 41 en el fondo de la jeringuilla y se humedece añadiendo unas gotas de PSG. Se vierten en la jeringuilla 2–2,5 ml del gel de celulosa equilibrada y se deja compactar durante 5 minutos antes de la elución del tampón. La altura del sedimento debe ser de aproximadamente 3 cm. Se lava y se equilibra la columna con 2 ml de PSG sin perturbar la superficie.

iv) *Adsorción de la sangre y elución de los tripanosomas*

Se depositan con cuidado 100–300 µl de sangre heparinizada (o preferiblemente capa leucocitaria) sobre la superficie de la columna de celulosa; se dejan penetrar en la celulosa, pero se debe impedir que la celulosa se seque antes de verter el tampón de elución. Se añaden progresivamente 1,5 ml de PSG y se comienza a recoger el eluato en una pipeta Pasteur de punta fina con su extremo sellado. Durante el proceso, la columna de celulosa debe permanecer constantemente húmeda. Se pone la pipeta llena, protegiendo su extremo con la punta de una pipeta cónica de plástico, dentro de un tubo y se centrifuga a 525 *g* (o hasta 1.000 *g*) durante 10 minutos. Se examina la parte inferior de la pipeta al microscopio (×100 o ×200) utilizando un dispositivo especial de montaje. Como alternativa, el eluato se puede recoger en tubos de plástico de 50 ml, con fondo cónico, y centrifugar a 1.000 *g*, y se puede examinar el sedimento por microscopía de fondo oscuro.

Un método similar, que se utiliza en ganado bovino, cerdos y cabras, también se denomina método de cromatografía de intercambio aniónico miniatura. Sin embargo, esta técnica, al ser lenta y cara, casi nunca se utiliza para el diagnóstico. Por el contrario, se pueden aplicar a grandes cantidades de sangre o capa leucocitaria de roedores infectados de forma experimental a grandes columnas, con el fin de llevar a cabo aislamientos masivos de parásitos para producir parásitos/antígenos para pruebas serológicas.

1.3. Inoculación en animales

Debido a la creciente preocupación bioética y a la tendencia a eliminar el uso de animales para las pruebas biológicas, la inoculación en animales debe limitarse todo lo posible y solo debe utilizarse si está plenamente justificada. Se pueden utilizar animales de laboratorio para poner de manifiesto infecciones subclínicas (no manifiestas) en animales domésticos. *Trypanosoma evansi* tiene un amplio rango de infectividad en los pequeños roedores, de modo que pueden utilizarse ratas y ratones. La inoculación de roedores no proporciona una sensibilidad del 100% (Monzon *et al.*, 1990) pero puede mejorarse la eficacia utilizando capa leucocitaria. Este procedimiento permitió detectar niveles tan bajos como de 1,25 células de *T. evansi* por ml de sangre. Esta técnica es adecuada cuando se precisa una detección muy sensible.

Se inocula por vía intraperitoneal sangre tratada con heparina sódica a ratas (1–2 ml) o ratones (0,25–0,5 ml). Se inocula un mínimo de dos animales. Se extrae sangre de la cola de los animales 48 horas post-infección para detectar y/o monitorizar la parasitemia. El período de incubación, antes de la aparición inicial de los parásitos y de su patogenicidad, dependerá de la cepa de los tripanosomas, de la concentración del inóculo y de la estirpe de animal de laboratorio utilizada; sin embargo, en la mayoría de los casos es muy corto (5 ± 2 días), aunque en algunos casos puede llegar a ser de 2 semanas (Monzon et al., 1990). La sensibilidad de este sistema de cultivo *in vivo* puede aumentar utilizando animales de laboratorio inmunosuprimidos. A tal fin, se pueden utilizar compuestos como ciclofosfamida o acetato de hidrocortisona. Esta intervención solo está justificada cuando es sumamente importante detectar un hospedador potencialmente infectado, por ejemplo, para confirmar un caso sospechoso en animales de alto valor, o para aislar un parásito para su posterior caracterización.

1.4. Detección del ADN de los tripanosomas

La detección de cantidades muy bajas de ADN de tripanosoma es un posible medio de identificación de los animales que presentan infecciones activas, ya que el ADN parasitario no permanece durante más de 24-48 horas en la sangre del hospedador una vez los tripanosomas han muerto (Desquesnes, 2004).

1.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en secuencias de ADN de distintos niveles taxonómicos. Hasta ahora, el método de referencia para la detección del subgénero *Trypanozoon* son los cebadores TBR (Masiga et al., 1992). Se han descrito otros cebadores (véase la Tabla 2) y se están evaluando; algunos de estos son específicos de *Trypanozoon* y otros, de *T. evansi* ± *T. equiperdum* (Desquesnes & Davila, 2002; Holland et al., 2001; Panyim et al., 1993). Hasta ahora, la prueba más sensible es la del ADN satélite utilizando cebadores TBR (Masiga et al., 1992); la sensibilidad de los demás cebadores se está comparando en distintas condiciones, entre ellas, en roedores de laboratorio, pero solo se puede validar con un lote suficiente de muestras de campo de hospedadores naturales. Se recomienda la utilización de cebadores TBR, al menos en primer lugar y, si es necesario, se confirma con otros conjuntos de cebadores específicos de *Trypanozoon*, como ESAG6/7 (Holland et al., 2001) o TEPAN (Panyim et al., 1993).

En zonas y en especies de hospedadores potencialmente infectados por otros *Trypanozoon*, como *T. brucei brucei*, se puede conseguir la confirmación de especie con cebadores más específicos, como RoTat 1.2 (Claes et al., 2004; Verloo et al., 2001) o EVAB, para cepas distintas de RoTat 1.2 (Ngaira et al., 2005). Los cebadores RoTat1.2 son buenos candidatos para un diagnóstico específico de *T. evansi*, sin embargo (i) exhiben una sensibilidad menor que los cebadores TBR (Elhaig & Sallam, 2018), (ii) no detectan *T. evansi* tipo B (Njiru et al., 2006), y (iii) amplifican un producto de 205 pb similar al esperado para *T. evansi* con algunas cepas de *T. brucei* y *T. equiperdum* (Abou El-Naga et al., 2012; Claes et al., 2003). Si se sospecha de *T. equiperdum*, se deben tener en cuenta otros datos epizootiológicos (entre los que son determinantes los signos clínicos y el modo de transmisión) ya que no existe, hasta el momento, una prueba molecular simple y fiable que pueda distinguir *T. evansi*, *T. equiperdum* y *T. brucei* spp. (Gizaw et al., 2017).

Cuando se sospecha de una subespecie de tripanosoma que afecta al ser humano, se pueden utilizar cebadores más específicos para detectar *T. b. gambiense* (Radwanska et al., 2002b) o *T. b. rhodesiense* (Radwanska et al., 2002a); sin embargo, al dirigirse a genes de copia única, exhiben una sensibilidad mucho menor que la TBR, lo que puede conducir a resultados no concluyentes cuando la PCR es negativa.

Si se sospecha de *Trypanosoma* spp. de otros subgéneros, se pueden usar cebadores que amplifican el espaciador transcrito interno 1 (ITS1) del ADN ribosómico, ya que pueden detectar varios subgéneros y especies en una sola reacción (Njiru et al., 2005), aunque con sensibilidad limitada. Se han desarrollado otras técnicas, como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Thekisoe et al., 2005) y la PCR en tiempo real (Sharma et al., 2012), pero deben evaluarse y validarse más a fondo respecto a la PCR estándar que utiliza cebadores TBR. Sea como fuere, estas técnicas son más caras que la PCR clásica.

La preparación del ADN es un paso importante que determina el éxito y la sensibilidad de la PCR. Se puede llevar a cabo con sangre total (normalmente se obtiene con anticoagulante) o bien, preferiblemente, con capa leucocitaria para aumentar la sensibilidad de la prueba (Desquesnes & Davila, 2002). Existen varias técnicas clásicas (Penchenier *et al.*, 1996), como kits comerciales y la preparación clásica con fenol-cloroformo. También puede utilizarse sangre conservada en alcohol al 70% en una proporción 1/1, o sobre papel de filtro seco (Hopkins *et al.*, 1998).

Al depender de la cantidad de ADN disponible, la sensibilidad de la PCR es proporcional a la parasitemia. Así pues, la PCR es más sensible en hospedadores muy susceptibles (camellos, caballos, perros, etc.) que en hospedadores de susceptibilidad media o baja (ganado bovino, búfalos, cerdos, etc.). Utilizando una preparación de ADN adecuada y los cebadores más sensibles de los que se disponga (TBR), la PCR puede detectar apenas 1-5 tripanosomas/ml de sangre (Panyim *et al.*, 1993; Penchenier *et al.*, 1996), o solo 10 por ml en búfalos mediante una PCR cuantitativa en tiempo real.

Tabla 2. Cebadores para la caracterización de *Trypanozoon*, *T. evansi* y *Trypanosoma spp.*

Especificidad	Secuencias de los cebadores (5' → 3')	Referencias
<i>Trypanozoon: T. b. brucei</i> , <i>T. b. gambiense</i> , <i>T. b. rhodesiense</i> , <i>T. evansi</i> y <i>T. equiperdum</i>)	TBR1: 5CGA-ATG-AAT-ATT-AAA-CAA-TGC-GCA-G	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TBR2: AGA-ACC-ATT-TAT-TAG-CTT-TGT-TGC	
<i>T. evansi</i> (tipo A) y ciertos <i>T. brucei</i> & <i>T. equiperdum</i>	RoTat1.2F: GCG-GGG-TGT-TTA-AAG-CAA-TA	Claes <i>et al.</i> , 2004
	RoTat1.2R: ATT-AGT-GCT-GCG-TGT-GTT-CG	
<i>T. evansi</i> (tipo B)	EVAB1: CAC-AGT-CCG-AGA-GAT-AGA-G	Njiru <i>et al.</i> , 2006
	EVAB2: CTG-TAC-TCT-ACA-TCT-ACC-TC	
<i>T. evansi</i> y ciertos <i>T. brucei</i> y <i>T. equiperdum</i>	TEPAN1: AGT-CAC-ATG-CAT-TGG-TGG-CA	Panyim <i>et al.</i> , 1993
	TEPAN2: GAG-AAG-GCG-TTA-CCC-AAC-A	
<i>T. evansi</i> y ciertos <i>T. brucei</i> y <i>T. equiperdum</i>	ESAG6/7F: ACA-TTC-CAG-CAG-GAG-TTG-GAG	Holland <i>et al.</i> , 2001
	ESAG6/7R: CAC-GTG-AAT-CCT-CAA-TTT-TGT	
<i>T. brucei gambiense</i>	Tgs-GP F: GCT-GCT-GTG-TTC-GGA-GAG-C	Radwanska <i>et al.</i> , 2002b
	TgsGP R: GCC-ATC-GTG-CTT-GCC-GCT-C	
<i>T. brucei rhodesiense</i>	Tbr F: ATA-GTG-ACA-AGA-TGC-GTA-CTC-AAC-GC	Radwanska <i>et al.</i> , 2002a
	Tbr R: AAT-GTG-TTC-GAG-TAC-TTC-GGT-CAC-GCT	
Pan-tryp.: <i>T. vivax</i> , <i>Trypanozoon</i> , <i>T. congolense savannah forest</i> , Kilifi, <i>T. lewisi</i> , etc.	TRYP1S: CGT-CCC-TGC-CAT-TTG-TAC-ACA-C	Desquesnes <i>et al.</i> , 2002
	TRYP1R: GGA-AGC-CAA-GTC-ATC-CAT-CG	
Pan-tryp.: <i>T. vivax</i> , <i>Trypanozoon</i> , <i>T. congolense savannah forest</i> , Kilifi, etc.	ITS1 CF: CCG-GAA-GTT-CAC-CGA-TAT-TG	Njiru <i>et al.</i> , 2005
	ITS1 BR: TTG-CTG-CGT-TCT-TCA-ACG-AA	

La PCR ofrece la alta sensibilidad y la alta especificidad que se requieren para la detección de la infección por tripanosomas (Masiga *et al.*, 1992), pero puede dar falsos negativos. En estudios experimentales en ovejas se ha observado que la PCR puede dar resultados negativos durante largos periodos de tiempo en fases de aparasitemia (Desquesnes, 2004), mientras que en búfalos la sensibilidad diagnóstica de la PCR ha sido solo del 78%, que es similar a la de la inoculación en ratón (Holland *et al.*, 2001). Sin embargo, la PCR es la técnica más sensible para detectar la infección activa.

1.5. Detección del antígeno

La detección del antígeno circulante en sangre o suero también es una forma de detectar la infección activa. Varios intentos de desarrollar este tipo de pruebas todavía no han logrado un nivel satisfactorio

como para recomendar su utilización sistemática para el diagnóstico (Desquesnes, 1996; Monzon, 2006; Morzaria *et al.*, 1996).

2. Pruebas serológicas

En el pasado, se han utilizado muchos métodos serológicos, pero ya no se recomiendan. El IFAT (Desquesnes 2004) sigue siendo útil para estudios a pequeña escala. La prueba de la tripanolisis (Van Meirvenne *et al.*, 1995) se utiliza para la confirmación individual de la positividad debido a su alta especificidad. Las otras pruebas ya no se utilizan porque han sido reemplazadas por técnicas más fáciles de estandarizar de ELISA (Desquesnes, 2004; Reid & Copeman; 2003), y CATT (Bajana Songa y Hamers, 1988; Njiru *et al.*, 2004) son los métodos de elección en la mayoría de circunstancias.

Se ha llevado a cabo una evaluación del ELISA y de la CATT en camellos, caballos, ganado bovino, búfalos y cerdos (Desquesnes *et al.*, 2009; Holland *et al.*, 2005; Reid & Copeman, 2003, entre otros). Preferiblemente, las pruebas deben llevarse a cabo con plasma o suero, pero la obtención de muestras puede simplificarse utilizando manchas de sangre en papel de filtro para utilizar posteriormente en el ELISA, mientras que para la CATT el suero puede sustituirse por sangre total (Hopkins *et al.*, 1998). Es muy importante que las pruebas serológicas se validen y estandaricen si se pretende que sean adecuadas para la identificación correcta de los animales infectados; para ello, se requiere una evaluación cruzada en distintos laboratorios. Tal vez deban establecerse criterios estándar de interpretación de las pruebas para cada especie, y estandarizarse al menos a nivel regional (Desquesnes, 2004). Como *T. evansi* se considera polifilético, habiendo evolucionado a partir de *T. brucei* (Lai *et al.*, 2008), es necesario tener en cuenta las diversas cepas que pueden estar presentes en un área determinada (RoTat frente a no RoTat, por ejemplo).

2.1. Prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

Aunque la técnica no se ha adoptado para estudios a gran escala, sigue siendo útil para cribar un pequeño número de muestras en laboratorios que están llevando a cabo la prueba para otros fines y/o que no están aplicando el ELISA. El coste de los reactivos es medio, de unos 0,5 €/prueba, pero la técnica es lenta.

2.1.1. Procedimiento analítico

El antígeno consiste en frotis secos de sangre que contengan entre cinco y diez *T. evansi* por campo a 500 aumentos, tomadas de un ratón o rata con una alta parasitemia (3–4 días post-infección). Los frotis se secan a temperatura ambiente durante 1 hora y se fijan con acetona (\pm etanol) durante 5 minutos. Si se mantienen secos, los frotis fijados pueden guardarse a -20°C durante varios meses. Los resultados se optimizan utilizando tripanosomas purificados separados de la capa leucocitaria de la rata en una columna de DEAE-celulosa (Lanham & Godfrey, 1970) utilizando una mezcla de acetona fría al 80% y formalina al 0,25% en una solución salina normal.

Durante la prueba, la muestra de los portas se subdivide inicialmente en varios círculos de 5 mm de diámetro con laca de uñas utilizando medio de montaje (o bien pueden utilizarse portas multipuntos recubiertos de Teflón), y a continuación se lavan con PBS, a pH 7,2, a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Tras el lavado, se añade un suero control positivo y uno negativo, y los sueros de campo que vayan a analizarse (diluidos a 1/50 en PBS), y se dejan reaccionar a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Se lavan los portas tres veces sucesivas con PBS durante 5 minutos cada una. A continuación, se añade un suero de conejo o cabra anti-IgG bovina (para realizar las pruebas con sueros bovinos) conjugado con isotiocianato de fluoresceína u otro antisuero conjugado con fluoresceína específico de la especie analizada, a una dilución adecuada, y se deja a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda. Se vuelven a lavar los portas en PBS, se montan con glicerol al 50% en medio de montaje con PBS para inmunofluorescencia, y se examinan mediante microscopía de fluorescencia. La solución de glicerol se debe guardar a 4°C y renovarse cada 2 semanas.

El conjugado de fluoresceína debe guardarse a -20°C en pequeñas alícuotas para evitar una reiterada congelación y descongelación. El tubo debe protegerse de la luz de algún modo, por

ejemplo envolviéndolo en papel de aluminio. El conjugado se diluye en PBS, a pH 7,2, o en PBS que contenga azul de Evans a una concentración de 1/1000 (p/v) como tinción de contraste para facilitar la discriminación entre fluorescencia positiva (verde) y negativa (roja). En general, los conjugados anti-IgG (cadena gamma) mono-específicos dan los resultados más específicos.

La seroconversión frente a *T. evansi* según la IFAT puede tardar 60 a 90 días. En comparación con la CATT, la IFAT es más sensible, probablemente porque permite detectar animales parasitemicos, pero la especificidad es más baja. En los casos dudosos, la interpretación es subjetiva y a veces se ha cuestionado la reproducibilidad. Por estos motivos, el ELISA es una técnica más aconsejable.

2.2. Enzimoinmunoanálisis (ELISA)

El principio de esta técnica se basa en que los anticuerpos específicos contra los tripanosomas se pueden detectar mediante anti-inmunoglobulinas ligadas a un enzima utilizando como fase sólida placas de poliestireno recubiertas de antígeno soluble. El enzima puede ser la peroxidasa, la fosfatasa alcalina o cualquier otro enzima apropiado. El enzima conjugado se une al complejo antígeno/anticuerpo y luego reacciona con un sustrato adecuado para producir un cambio de color característico del sustrato mismo o de un indicador añadido (el cromógeno).

El antígeno de recubrimiento de las placas se obtiene de la sangre de una rata con elevada parasitemia. Los tripanosomas se concentran en la capa leucocitaria por centrifugación y se separan en una columna de DEAE-celulosa y se lavan tres veces mediante centrifugación en PSG fría, a pH 8 (PBS con un 1% de glucosa). El precipitado final se suspende en PSG fría hasta una concentración del 5%, junto con un cóctel inhibidor de la proteasa² se somete a cinco ciclos de congelación-descongelación, y se ultrasonica tres veces durante 2 minutos sobre hielo para garantizar una desintegración completa de los microorganismos. Esta preparación se centrifuga a 4°C y 10 000 *g* durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante y se estima la concentración de proteína mediante lecturas de UV a 260 nm y a 280 nm o por colorimetría. El antígeno soluble así obtenido se puede guardar en pequeñas alícuotas a -80°C durante varios meses o a -20 °C durante periodos más cortos. También se puede liofilizar y mantener a -20°C.

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se diluye el antígeno soluble a 5 µg/ml en tampón de carbonato/bicarbonato 0,01 M recién preparado, a pH 9,6. Se añaden 100 µl a cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos, y las placas se incuban durante toda la noche a 4°C o durante 1 hora a 37°C en un agitador-incubadora (300 rpm). Para este paso, las inmunoplasmas que garantizan que se conservan las actividades específicas de los epítopos durante la unión a la superficie de la placa³ son preferibles a otras placas que podrían permitir que se perdiera la claridad de los epítopos o que estos se alteraran debido a unas características de unión más específicas.
- ii) Se elimina el antígeno y se añaden 150 µl de tampón bloqueante (BB: PBS 0,01 M que contenga un 0,1% de Tween 20 y un 5% de leche desnatada en polvo) durante 1 hora a 37°C. La calidad de la leche desnatada es crucial⁴; la concentración óptima de leche desnatada puede oscilar entre el 0,5% y el 7%, en función de cuál sea su origen. Como agente bloqueante también puede utilizarse soroalbúmina bovina.
- iii) Se añaden diluciones del suero problema en BB (100 µl), por duplicado o por triplicado. Se incluyen sueros control negativo y positivo. La dilución final se lleva a cabo a 1/100. Se incuban las placas a 37°C durante 30 minutos. Se elimina el contenido y se lavan cinco veces con tampón de lavado (PBS con un 0,1% de Tween 20).
- iv) Se añade la anti-globulina específica de especie conjugada con peroxidasa (100 µl) convenientemente diluida en BB (normalmente entre 1/5.000 y 1/20.000). Si no se dispone de conjugados específicos de especie, pueden utilizarse conjugados con proteína A o proteína G. Se vuelven a incubar las placas a 37°C durante 30 minutos, se desecha el contenido y se lavan tres veces con tampón de lavado.

2 Solución completa para el inhibidor de la proteasa; Roche Molecular Biochemicals

3 Por ejemplo: las inmunoplasmas Polysorp Nunc®

4 Por ejemplo: ref: 190-12865, Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japón.

- v) En conjugados con peroxidasa se pueden utilizar varias soluciones de sustrato/cromógeno, que constan de peróxido de hidrógeno con un cromógeno, como tetrametilbenzideno (TMB), ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y orto-difenilendiamina (OPD). Una solución adecuada de sustrato/cromógeno para conjugados con peroxidasa es el peróxido de hidrógeno al 30% (0,167 ml y 35 mg) en tampón citrato (100 ml), pH 6,0. El tampón citrato se prepara así: Solución A (36,85 ml): (0,1 mmol de ácido cítrico [21,01 g/litro]); Solución B: (65,15 ml): (0,2 mol de Na₂HPO₄ [35,59 g/litro]; y agua destilada (100 ml). Se disuelven 10 mg de TMB en 1 ml de dimetilsulfóxido y se añaden a 99 ml del tampón citrato. Varias de estas combinaciones se venden listas para su uso, y pueden permanecer estables a 4°C hasta 1 año. Se añade el sustrato cromógeno (100 µl) a las placas y se incuban en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 20–30 minutos.
- vi) Se leen las placas o se detiene la reacción añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 1 M. La absorbancia de la mezcla de cada pocillo se lee a 450 nm en el caso del cromógeno TMB. Otros cromógenos pueden requerir lecturas a otras longitudes de onda. Todas las pruebas deben incluir tres sueros control positivos y tres negativos: alto, medio y bajo, así un tampón control. Los resultados se expresan en porcentaje relativo de positividad según las densidades ópticas de las muestras control (Desquesnes, 2004; Desquesnes et al., 2009).

Existe una amplia variedad de procedimientos analíticos, por ejemplo, utilizando antígeno nativo purificado o, más recientemente, utilizando antígenos recombinantes (Tran et al., 2009). Para las especies animales estrechamente relacionadas, a menudo se pueden utilizar reactivos que dan reacción cruzada (por ejemplo, la anti-inmunoglobulina bovina en el caso de los búfalos) y en general se recomienda la utilización de conjugados anti-IgG monoespecíficos. Sin embargo, cuando no se dispone de conjugados específicos, pueden utilizarse proteínas inespecíficas capaces de fijarse al fragmento de las inmunoglobulinas de la CF, como proteína A (para la detección de IgG) o proteína G (para la detección de IgM). Se ha validado un conjugado de proteína A para su uso en camellos (Desquesnes et al., 2009).

Hay varios métodos que se pueden utilizar para determinar un umbral para la diferenciación entre resultados positivos y negativos. El método más simple es basar el corte en la inspección visual de los resultados de la prueba obtenidos con poblaciones que se sepa que son negativas o positivas (Desquesnes, 2004). Es probable que estos resultados muestren cierto solapamiento. El operario puede elegir el punto más adecuado para ajustar las tasas de los falsos positivos y falsos negativos en función de la aplicación requerida de la prueba. Una alternativa es establecer el corte en el valor medio + 2 desviaciones estándar (SD) o +3 SD de los resultados obtenidos en una muestra grande de animales negativos. Finalmente, si no se dispone de muestras positivas/negativas se puede establecer el corte de acuerdo con el análisis de los datos de animales en situación endémica. Si se separan los animales infectados y los no infectados según una distribución bimodal, entonces se puede seleccionar un valor adecuado. Es probable que los métodos de ELISA identifiquen correctamente los animales no infectados (mientras que la CATT calificaría correctamente los infectados). En Vietnam, se utilizó con éxito un nuevo ELISA/RoTat 1.2 basado en la VSG del clon RoTat 1.2 de *T. evansi* - un antígeno predominante en *T. evansi* (Verloo et al., 2001); se pueden consultar los protocolos y los reactivos en el Laboratorio de Referencia de la OIE del ITM (Amberes) para su utilización en équidos, camélidos y búfalos de agua. En el ITM recientemente se ha desarrollado otra prueba basada en la glucoproteína de superficie invariante (Tran et al., 2009) y debe someterse a una evaluación interlaboratorial.

Las VSG podrían ser demasiado específicas como para ser utilizadas como antígenos en un ELISA universal para *T. evansi* (véase abajo parásitos RoTat frente a parásitos no RoTat), mientras que el ELISA utilizando antígenos solubles no es específico de cepa y ello lo cualifica como prueba universal. Los antígenos solubles procedentes de lisado entero de *T. evansi* también sirven para detectar inmunoglobulinas dirigidas contra cepas de *T. evansi* presentes en distintas especies hospedadoras y zonas geográficas; también pueden servir para detectar infecciones en sistemas heterólogos debido a las fuertes reacciones cruzadas con *T. vivax*, *T. congolense* e incluso *T. cruzi*. Por tanto, el antígeno soluble de *Trypanosoma evansi* debe considerarse un reactivo universal para la detección de *T. evansi*, pero debe tenerse en cuenta la especificidad de especie en zonas donde haya varias especies. El coste de los reactivos es bajo, de alrededor de 0,1 €/prueba, y la técnica es rápida, ya que permite analizar 500 muestras al día si el técnico tiene experiencia.

2.3. Pruebas de aglutinación en placa

Se sabe que varias cepas de tripanosomas salivales de diferentes áreas tienen en común algunos tipos predominantes de antígenos variables (VAT). Este hallazgo se utilizó como base para una prueba de diagnóstico de *T. evansi*, la prueba de la aglutinación en tarjeta - CATT/*T. evansi* (Bajyana Songa & Hamers, 1988). En esta prueba se utilizan tripanosomas fijados y teñidos de un VAT definido conocido como RoTat 1.2. Se puede agregar antígenos de superficie, tanto variables como invariables, mediante anticuerpos específicos (denominados aglutininas), los cuales son responsables de la reacción de aglutinación. En el Laboratorio de Referencia de la OIE se dispone del kit comercial de la CATT/*T. evansi* (ITM, Antwerp, Bélgica). Consta de parásitos ("antígeno") liofilizados, PBS, pH 7,4, tarjetas recubiertas de plástico, espátulas, sueros control positivos y negativos liofilizados y un rotor. El antígeno liofilizado puede guardarse a 2–8°C hasta 1 año. El antígeno reconstituido se puede mantener a 2–8°C durante 1 semana, pero cuando se guarda a 37°C es preferible utilizarlo en un máximo de 8 horas.

Para el cribado, se diluyen los sueros problema a 1/4 o 1/8 en PBS. Se depositan 45 µl de la suspensión de antígeno preparada (previamente bien agitada para homogeneizar la suspensión de parásito) en los círculos grabados sobre las tarjetas de plástico. Se añaden 25 µl de cada suero problema diluido. Se mezclan y se extienden los reactivos con una espátula, dejando que la tarjeta gire durante 5 minutos en el rotor suministrado con el equipo (o a 70 rpm en un agitador de rotor clásico). Se compara el modelo de aglutinación con las ilustraciones de diferentes reacciones suministradas con el equipo. La aparición de depósitos azules granulares revela una reacción positiva que es visible a simple vista. El coste de los reactivos es medio, y un técnico puede llevar a cabo unas 200 pruebas al día.

El CATT/*T. evansi* es adecuado para la detección de infecciones agudas y crónicas con un alto valor predictivo positivo. CATT/*T. evansi* es más probable que clasifique correctamente a los animales verdaderamente infectados; se puede utilizar para seleccionar animales individuales para el tratamiento con fármacos tripanocidas. La sensibilidad de CATT/*T. evansi* varía de una especie hospedadora a otra; generalmente, es alta en caballos, media en camellos y búfalos, y menor en cerdos y bovinos (Desquesnes *et al.*, 2011; Hagos *et al.*, 2009; Holland *et al.*, 2005), y puede verse afectada por la presencia de cepas no RoTat 1.2 en algunas áreas (Hagos *et al.*, 2009; Njiru *et al.*, 2004). Los animales infectados por *T. evansi*, *T. equiperdum*, *T. brucei* e incluso *T. vivax* pueden dar una respuesta positiva al CATT/*T. evansi* (Birhanu *et al.*, 2015; Desquesnes, 2004; Gizaw *et al.*, 2017). CATT/*T. evansi*, por lo tanto, no se considera especie específica. Además de esto, se puede observar una aglutinación inespecífica en poblaciones de hospedadores que no están infectados por tripanosomas, con tasas variables según la especie de hospedador. Sin embargo, dado que CATT/*T. evansi* (i) es el único kit disponible para el diagnóstico de surra, (ii) posiblemente se utilice en todas las especies de mamíferos, y (iii) presenta un alto valor predictivo positivo, se recomienda en el serodiagnóstico de la surra.

2.4. Prueba de la inmunotripanolisis RoTat1.2 (TL RoTat1.2)

La prueba de la inmunotripanolisis detecta anticuerpos "triplanólíticos" específicos dirigidos contra una cepa parasitaria dada capaz de inducir tripanolisis en presencia del complemento. Se lleva a cabo con antígeno variable (VAT) de *T. evansi* tipo RoTat 1.2 y, por tanto, puede ser positiva solo con hospedadores que produzcan inmunoglobulinas tripanolíticas dirigidas contra el VAT RoTat 1.2 (Van Meirvenne *et al.*, 1995). Los sueros se analizan a una dilución de 1/4. Se incuban tripanosomas vivos durante 60 minutos con suero problema en presencia de suero de cobaya como fuente de complemento. Cuando en el suero hay anticuerpos específicos de la variante, se produce lisis de los tripanosomas con antígeno RoTat 1.2. La muestra se considera que contiene anticuerpos anti-RoTat 1.2 cuando el 50% o más de los tripanosomas resultan lisados. Esta prueba requiere la producción de complemento y el crecimiento de tripanosomas en roedores y, por tanto, es cara y éticamente controvertida. Actualmente se utiliza principalmente para confirmar muestras sospechosas de ser positivas según otras pruebas. Se puede llevar a cabo en el ITM, Amberes, previa solicitud. Esta prueba tiene un coste alto.

2.5. Prueba del formol-gel

La prueba del formol-gel es la prueba de elección en camellos pero no ha sido validada en otras especies. Se lleva a cabo añadiendo dos gotas de solución de formalina concentrada (formaldehído al 40% [p/v]) a 1 ml de suero. La prueba es positiva si el suero se coagula inmediatamente y se vuelve

blanco. En las reacciones negativas, el suero permanece sin alteraciones o la coagulación puede tardar hasta 30 minutos en aparecer.

3. Aplicaciones analíticas

Como ocurre con la mayoría de pruebas biológicas, los métodos descritos en este capítulo presentan limitaciones, tanto en términos de sensibilidad como de especificidad. Además, tanto los rendimientos como los parámetros analíticos varían en gran medida, en función de la especie y la raza hospedadora, la diversidad de especies de tripanosomas en la zona geográfica en la que se encuentra el hospedador, y la situación epidemiológica (epizootica/enzoótica/epidémica). Hasta ahora, no existen ninguna prueba (parasitológica, serológica ni molecular) capaz de distinguir *T. evansi* de las otras especies o subespecies de *Trypanozoon* (Gizaw et al., 2017). El diagnóstico final de la surra se basa en una información epizootológica, en los signos clínicos y en los resultados de laboratorio. Por estos motivos, actualmente se recomiendan varias de estas combinaciones analíticas adaptadas a las distintas circunstancias relevantes para un hospedador y zona geográfica determinados. Existen directrices que deberían contribuir a lograr los diagnósticos correctos. La combinación de al menos dos de los cuatro métodos se recomienda para optimizar el diagnóstico y hacerlo fiable y específico.

3.1. Características y rendimientos de las pruebas recomendadas para el diagnóstico de la surra

- i) *Examen microscópico*: La observación microscópica (a $\times 400$ – 1000 en aceite de inmersión) de una gota fina de sangre del hospedador teñida con Giemsa (GSBS), o procedente de una prueba de inoculación en ratón, permite identificar el subgénero *Trypanozoon* en base a la morfología y la morfometría del parásito. Cuando se dispone de muestras frescas, se recomienda combinar el examen microscópico con HCT (o BCT) para aumentar la sensibilidad de aquel. La observación de un parásito proporciona cierto grado de diagnóstico, pero la identificación a nivel de especie requiere pruebas complementarias si se sospecha de otras *Trypanosoma* spp. patógenas en el hospedador estudiado.
- ii) *PCR-TBR*: Debe prepararse ADN a partir de sangre con un kit comercial, una resina, o método del fenol-cloroformo, utilizando una capa leucocitaria obtenida mediante centrifugación de 0,5 ml de sangre a 8.000 *g*. Se lleva a cabo la PCR como se ha indicado anteriormente, con cebadores TBR (Masiga et al., 1992). El resultado se considerará positivo para *Trypanozoon* cuando en el gel de agarosa se observe un producto de 177 pb. Se pueden utilizar cebadores complementarios (i) para confirmar el subgénero (TEPAN o ESAG), (ii) para caracterizar el tipo A/B: (RoTat1.2 y EVAB), (iii) para caracterizar cepas humanas (Tgs-GP y Tbr) , o (iv) como evidencia de otros subgéneros o especies de *Trypanosoma* (cebadores ITS1); sin embargo, dado que la sensibilidad de todos estos cebadores es menor que la de los cebadores TBR, cuando son negativos, pueden dar lugar a resultados no concluyentes
- iii) *ELISA para T. evansi*: Se analizan muestras de suero o de plasma mediante ELISA para *T. evansi* (antígenos solubles de lisado de *T. evansi* entero) como se ha descrito anteriormente. Una muestra se considera positiva cuando su RPP es superior al valor de corte establecido para la especie hospedadora (existen conjugados definidos como apropiados para cada especie; véase el apartado siguiente). Su valor predictivo negativo es muy alto a no ser que el hospedador se haya infectado muy recientemente.
- iv) *CATT para T. evansi*: Se diluye suero o plasma a 1:4 y se analiza como ha descrito el fabricante. Las muestras positivas son las que presentan resultados de $\geq 1+$ (las muestras dudosas se consideran negativas). El valor predictivo positivo es alto; sin embargo, puede producirse una aglutinación inespecífica. En general, se recomienda combinar ELISA de *T. evansi* y CATT/*T. evansi* para aumentar la sensibilidad y la fiabilidad del diagnóstico; sin embargo, en caso de discrepancia, se recomienda repetir el muestreo y la prueba.

Los conjugados que se utilizarán en ELISA de *T. evansi* para cada especie hospedadora son: bovinos y búfalos: molécula completa anti-IgG bovina; cerdo y elefante: conjugado de proteína G; camellos: proteína A conjugada; perro: molécula anti-conjugado canino; cabra y ovino: moléculas anti-conjugado caprino u ovino; rata: molécula completa anti-IgG de rata. Los conjugados para otras especies hospedadoras están por definir.

3.2. Asociación de pruebas recomendadas para el diagnóstico de la surra en animales

3.2.1. Método recomendado para una detección sensible del agente

Se recomienda una combinación de las técnicas GSBS, HCT y una PCR sensible (basada en la detección de ADN con satélite) para la detección del agente patógeno; cuando los resultados sean positivos, deberán completarse con PCR más específicas. En caso de infección mixta por distintos tripanosomas, deben utilizarse otros cebadores, como se indica en el Capítulo 3.4.14 *Nagana: infecciones por tripanosomas salivarianos (excepto Trypanosoma evansi y T. equiperdum)*.

3.2.2. Métodos recomendados para la detección de anticuerpos

Se recomienda una combinación de ELISA de *T. evansi* utilizando antígenos solubles de lisado de tripanosoma completo y CATT/*T. evansi* (prueba basada en RoTat1.2) para detectar anticuerpos dirigidos contra todos los tipos de *T. evansi*. En caso de infección mixta por distintos tripanosomas, debido a reacciones cruzadas bilaterales entre tripanosomas, las inferencias sobre la especificidad de la especie deben basarse preferiblemente en los resultados de la PCR.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No existen vacunas para esta enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

ABOU EL-NAGA T.R., BARGHASH S.M., MOHAMMED A.-H.H., ASHOUR A.A. & SALAMA M.S. (2012). Evaluation of (Rotat 1.2-PCR) Assays for Identifying Egyptian *Trypanosoma evansi* DNA. *Acta Parasitologica Globalis* **3**, 01–06.

BAJYANA SONGA E. & HAMERS R. (1988). A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1–2 of *Trypanosoma evansi*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, **68**, 233–240.

CLAES F., RADWANSKA M., URAKAWA T., MAJIWA P.A., GODDEERIS B. & BUSCHER P. (2004). Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, **3**, 3.

DESQUESNES M. (2004). Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America. 2004, CIRAD-EMVT publication, OIE, Paris, France, ISBN 92-9044-634-X. 174 p.

DESQUESNES M., BOSSARD G., THEVENON S., PATREL D., RAVEL S., PAVLOVIC D., HERDER S., PATOUT O., LEPETITCOLIN E., HOLLZMULLER P., BERTHIER D., JACQUIET P. & CUNY G. (2009). Development and application of an antibody-ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. *Vet. Parasitol.*, **162**, 214–220.

DESQUESNES M., DARGANTES A., LAI D.H., LUN Z.R., HOLZMULLER P. & JITTAPALAPONG S. (2013b). *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 321237.

DESQUESNES M. & DAVILA A.M. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Vet. Parasitol.*, **109**, 213–231.

DESQUESNES M., HOLZMULLER P., LAI D.H., DARGANTES A., LUN Z.R. & JITTAPALAPONG S. (2013a). *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 194176.

DESQUESNES M., KAMYINGKIRD K., VERGNE T., SARATAPHAN N., PRANEE R. & JITTAPALAPONG S. (2011). An evaluation of melarsomine hydrochloride efficacy for parasitological cure in experimental infection of dairy cattle with *Trypanosoma evansi* in Thailand. *Parasitology*, **138**, 1134-1142.

- DESQUESNES M., RAVEL S. & CUNY G. (2002). PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, **1**, 2.
- ELHAIG M.M. & SALLAM N.H. (2018). Molecular survey and characterization of *Trypanosoma evansi* in naturally infected camels with suspicion of a *Trypanozoon* infection in horses by molecular detection in Egypt. *Microb. Pathog.*, **123**, 201–205.
- GILL B.S. (1977). Trypanosomes and trypanosomiasis of Indian livestock. Indian Council of Agricultural Research, Edit. ICAR New Delhi, 1977, A booklet, 137 p.
- GIZAW Y., MEGERSA M. & FAYERA T. (2017). Dourine: a neglected disease of equids. *Trop. Anim. Health Prod.*, **49**, 887–897.
- GUTIERREZ C., CORBERA J.A., JUSTE M.C., DORESTE F. & MORALES I. (2005). An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the Canary Islands. *Vet. Parasit.*, **130**, 163–168.
- HAGOS A., YILKAL A., ESSAYAS T., ALEMU T., FIKRU R., FESEHA G., AB FESEHA G., GODDEERIS B.M. & CLAES F. (2009). Parasitological and serological survey on trypanosomes (surra) in camels in dry and wet areas of Bale Zone, Oromyia Region, Ethiopia. *Revue Méd. Vét.*, **160**, 569–573.
- HOLLAND W.G., CLAES F., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSE J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet. Parasit.*, **97**, 23–33.
- HOLLAND W.G., THANH N.G., DO T.T., SANGMANEEDET S., GODDEERIS B. & VERCRUYSE J. (2005). Evaluation of diagnostic tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs and subsequent use in field surveys in North Vietnam and Thailand. *Trop. Anim. Health Prod.*, **37**, 457–467.
- HOPKINS J.S., CHITAMBO H., MACHILA N., LUCKINS A.G., RAE P.F., VAN DE BOSSCHE P. & EISLER M. (1998). Adaptation and validation of antibody-ELISA using dried blood spots on filter paper for emidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomosis in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **37**, 91–99.
- LAI D.H., HASHIMI H., LUN Z.R., AYALA F.J. & LUKES J. (2008). Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 1999–2004.
- LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian Trypanosomes from man and other mammals using DEAE – Cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521–534.
- LUN Z.R., LAI D.H., WEN Y.Z., ZHENG L.L., SHENG J.L., YANG T.B., ZHOU W.L., HIDE G., QU L.H. & AYALA F.J. (2015). Cancer in the parasitic protozoans *Trypanosoma brucei* and *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 8835–8842.
- MASIGA D.K., SMYTH A.J., HAYES P., BROMIDGE T.J. & GIBSON W.C. (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.*, **22**, 909–918.
- MONZON C.M., MANCEBO O.A. & ROUX J.P. (1990). Comparison between 6 parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Vet. Parasitol.*, **36**, 141–146.
- NGAIRA J.M., OLEMBO N.K., NJAGI E.N. & NGERANWA J.J. (2005). The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.*, **110**, 30–38.
- NJIRU Z.K., CONSTANTINE C.C., GUYA S., CROWTHER J., KIRAGU J.M., THOMPSON R.C. & DÁVILA A.M. (2005). The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol. Res.*, **95**, 186–192.
- NJIRU Z.K., CONSTANTINE C.C., MASIGA D.K., REID S.A., THOMPSON R.C. & GIBSON W.C. (2006). Characterization of *Trypanosoma evansi* type B. *Infect. Genet. Evol.*, **6**, 292–300.
- NJIRU Z.K., CONSTANTINE C.C., NDUNG’U J.M., ROBERTSON I., OKAYE S., THOMPSON R.C. & REID S.M. (2004). Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/*T. evansi* tests in Kenya. *Vet. Parasitol.*, **124**, 187–199.

PANYIM S., VISESHAKUL N., LUXANANIL P., WUYTS N. & CHOKESAJJAWATEE N. (1993). A PCR method for highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* in blood samples. Proceedings of EEC contractants workshops, Resistance or tolerance of animals to diseases and veterinary epidemiology and diagnostic methods, Rethymno, Greece, 2–6 November 1992. CIRAD-EMVT, Maisons Alfort, France (Monographie), 138–143.

PENCHENIER L., DUMAS V., GREBAUT P., REIFENBERG J.-M. & CUNY G. (1996). Improvement of blood and fly gut processing for PCR diagnosis of trypanosomosis. *Parasite*, **4**, 387–389.

RADWANSKA M., CHAMEKH M., VANHAMME L., CLAES F., MAGEZ S., MAGNUS E., DE BAETSELIER P., BÜSCHER P. & PAYS E. (2002a). The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67**, 684–690.

RADWANSKA M., CLAES F., MAGEZ S., MAGNUS E., PEREZ-MORGA D., PAYS E. & BÜSCHER P. (2002b). Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **67**, 289–295.

REID S.A. & COPEMAN D.B. (2003). The development and validation of an antibody–ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. *Prev. Vet. Med.*, **61**, 195–208.

SHARMA P., JUYAL P.D., SINGLA L.D., CHACHRA D. & PAWAR H. (2012). Comparative evaluation of real time PCR assay with conventional parasitological techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in cattle and buffaloes. *Vet. Parasitol.*, **190**, 375–382. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.07.005

THEKISOE O.M., INOUE N., KUBOKI N., TUNTASUVAN D., BUNNOY W., BORISUTSUWAN S., IGARASHI I. & SUGIMOTO C. (2005). Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. *Vet. Parasitol.*, **130**, 327–330.

TRAN T., CLAES F., VERLOO D., DE GREEVE H. & BUSCHER P. (2009). Towards a new reference test for surra in camels. *Clin. Vaccine Immunol.*, **16**, 999–1002.

VAN MEIRVENNE N., MAGNUS E. & BUSCHER P. (1995). Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.*, **60**, 189–199.

Van Vinh Chau N., Buu Chau L., Desquesnes M., Herder S., Phu Huong Lan N., Campbell J.I., Van Cuong N., Yimming B., Chalermwong P., Jittapalapong S., Ramon Franco J., Tri Tue N., Rabaa M.A., Carrique-Mas J., Pham Thi Thanh T., Tran Vu Thieu N., Berto A., Thi Hoa N., Van Minh Hoang N., Canh Tu N., Khac Chuyen N., Wills B., Tinh Hien T., Thwaites G.E., Yacoub S. & Baker S. (2016). A Clinical and Epidemiological Investigation of the First Reported Human Infection With the Zoonotic Parasite *Trypanosoma evansi* in Southeast Asia. *Clin. Infect. Dis.*, **62**, 1002–1008.

VENTURA R.M., TAKEDA G.F., SILVA R.A., NUNES V.L., BUCK G.A. & TEIXEIRA M.M. (2002). Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *Int. J. Parasitol.*, **32**, 53–63.

VERLOO D., MAGNUS E. & BUSCHER P. (2001). General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Vet. Parasitol.*, **97**, 183–189.

ZABLOTSKIY V.T., GEORGIU C., DE WAAL T., CLAUSEN P.H., CLAES F. & TOURATIER L. (2003). The current challenges of dourine: difficulties in differentiating *Trypanosoma equiperdum* within the subgenus *Trypanozoon*. *Rev. Sci. Tech.*, **22**, 1087–1096.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la surra (infecciones por *Trypanosoma evansi*) (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

Por favor, contacte los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la surra.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991 COMO SURRA (*TRYPANOSOMA EVANSI*):
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.