

## INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA EVANSI* (SURRA)

---

### RESUMEN

**Definición 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, incluidas 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.

**Descripción de la enfermedad:** 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 la siedad, 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 y los camellos. En los caballos 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).

**Identificación del agente:** Los signos clínicos generales de la infección por *T. evansi* no son suficientemente patognomónicos para el diagnóstico. 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 enzimoimmunoanálisis (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 que puedan efectuarse en el establo. 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 – preferiblemente complementado con 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* causa una enfermedad denominada surra en la India, y, entre otras denominaciones, *El Debab*, *El Gafar*, *Tabourit* o *MBori* en el Norte de África, y *Mal de Caderas* o *Murrina* en Latinoamérica. Los signos clínicos de la surra son indicativos pero no suficientemente patognomónicos, de modo que el diagnóstico debe confirmarse mediante pruebas de laboratorio (Dia *et al.*, 1997a). En los animales susceptibles, que son los camellos (dromedarios y bactrianos), los caballos, los búfalos, el ganado bovino y los cerdos, 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 serosas. En los casos avanzados, los parásitos invaden el sistema nervioso central (SNC), lo cual puede conllevar signos nerviosos (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 de que la enfermedad causa inmunodeficiencia (Dargantes *et al.*, 2005b; Onah *et al.*, 1998).

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 y los caballos, pero también en los búfalos, el ganado bovino, las llamas y los perros, aunque estas especies hospedadoras pueden desarrollar infecciones leves o subclínicas. Los animales salvajes, como el ciervo, el capibara o el coatí pueden resultar infectados y enfermar (e incluso morir), pero también pueden 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 (Brun *et al.*, 1998; Claes *et al.*, 2003), y morfológicamente se parece a las formas esbeltas de las especies 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). La caracterización molecular de cepas de *T. evansi* y de *T. equiperdum* mediante técnicas de 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* (Claes *et al.*, 2005; Zablotskiy *et al.*, 2003), y la existencia de *T. equiperdum* incluso se ha cuestionado.

Como todos los tripanosomas patógenos, *T. evansi* está recubierto por una densa capa proteica formada por una única proteína denominada glucoproteína variable de superficie (VSG). Esta actúa como el inmunógeno principal e induce la formación 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.

En el campo puede surgir la sospecha clínica de surra en caso de 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 (Dargantes *et al.*, 2005a).

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 CATT puede utilizarse para detectar animales individualmente con el fin de tratarlos con fármacos tripanocidas.

Cuando es necesaria una confirmación definitiva de la infección en animales sospechosos (por ejemplo, para la importación a zonas libres de la enfermedad), la inoculación en ratones es la mejor prueba. No obstante, el análisis de animales debe restringirse solo a los casos estrictamente justificados.

Para declarar el estado de ausencia de enfermedad a nivel individual se recomienda el análisis seriado mediante CATT y ELISA a intervalos de 40 días. Sin embargo, deben definirse las condiciones para la importación de animales procedentes de zonas infectadas a zonas no infectadas, incluyendo el estado de la explotación exportadora, el estado de los animales exportados, la aplicación de un protocolo de diagnóstico y, posiblemente, la administración preventiva de tratamientos curativos.

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. En estas condiciones, no puede establecerse el estado exacto de un animal en cuanto a la tripanosomosis.

La OIE ha desarrollado monografías estandarizadas a nivel internacional para los fármacos tripanocidas.

## 1. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

No se ha demostrado que *Trypanosoma evansi* comporte riesgo zoonótico. Debe manipularse en el laboratorio de acuerdo con los principios destacados en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

### 1. Identificación 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 se encuentra *Trypanozoon* spp. además de *T. evansi*, no es posible la identificación específica mediante microscopía; en estos casos, las técnicas moleculares son muy útiles para el diagnóstico específico de especie.

#### 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  $\mu$ l) y se coloca encima un cubre para extender la sangre como si fuera una monocapa de células. Esta se examina por microscopía óptica ( $\times 200$ ) para detectar posibles tripanosomas móviles. Puede mejorarse la visualización utilizando la microscopía de campo oscuro o de contraste de fases (200–400  $\times$ ). La sensibilidad de este método es baja, de unos 10 tripanosomas por  $\mu$ l, lo cual solo es frecuente en las infecciones tempranas o agudas.

##### 1.1.3. Tinción de gotas gruesas

En el centro de un porta para microscopía se deposita una gota grande de sangre (10  $\mu$ 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 mixtas.

#### 1.1.4. Tinción de gotas finas

Se coloca una pequeña gota de sangre (3–5 µl) 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 son las más utilizadas<sup>1</sup>, que 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 e identificar la especie de *Trypanosoma*, pero tiene muy poca sensibilidad (permite detectar parasitemias de >500.000 tripanosomas/ml de sangre).

#### 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). 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 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 los parásitos. En estas circunstancias, son necesarios métodos de concentración, puesto que estos aumentan la sensibilidad del examen microscópico.

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

Se extrae sangre (70 µl) y se coloca en dos tubos capilares heparinizados (75 × 1,5 mm). Se obtura el extremo húmedo con plastilina y se centrifugan a 3000 *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 eritrocitos (RBC) respecto al volumen total de sangre; 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 porta. 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 x). 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. En el Laboratorio de Referencia de la OIE para la Surra, en el Instituto de Medicina Tropical (ITM)<sup>2</sup>, pueden conseguirse cámaras de lectura especialmente diseñadas para HCT. Cuanto más fresca sea la muestra, más sensible será la prueba, puesto que los fuertes movimientos del parásito hacen a los tripanosomas más visibles. Esta técnica permite detectar unos 50-200 tripanosomas/ml de sangre (Desquesnes & Tresse, 1996). La capa leucocitaria también puede recogerse con un microtubo y congelarse; además, la muestra puede prepararse para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### 1.2.2. Técnica de la capa leucocitaria en fondo oscuro/contraste de fases (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 diamante de corte y se rompe 0,5 mm por debajo de la capa leucocitaria, de modo que la parte de arriba

---

1 Por ejemplo: Diff-Quick®, RAL555®

2 Laboratory of Parasite Diagnostic, Institute of Tropical Medicine, Nationalestraat 155, B-2000 Amberes, Bélgica. pbuscher@itg.be; fclaes@itg.be

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 describas, a 200–500 aumentos. Se observan tripanosomas principalmente en la periferia del material denso de la capa leucocitaria.

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 se puede utilizar como criterio (cuando es inferior al 24%, por ejemplo en el ganado bovino) de elección de un subgrupo de muestras que se enviarán para realizar un análisis mediante PCR, más caro (Desquesnes *et al.*, 1999).

### 1.2.3. Técnica de centrifugación en minicolumna de 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 Whatman DE 52) 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 (Lumdsen *et al.*, 1981). Se ha desarrollado un método de campo simplificado para la detección de parasitemias bajas (Sachs, 1984). La sensibilidad de esta técnica puede aumentarse aproximadamente diez veces cuando se utilizan preparaciones de capa leucocitaria en vez de sangre total (Reid *et al.*, 2001).

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

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro (13,48 g); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (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 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 a baja velocidad. Se ajusta el pH a 8 con ácido fosfórico. Se deja reposar durante 30 minutos. Se elimina el sobrenadante, que contiene los gránulos más finos. Se repite el proceso tres veces. Se guarda la suspensión concentrada equilibrada de DEAE-celulosa (gel) a 4°C si el periodo de almacenaje va a ser corto, o bien en pequeñas alícuotas 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 ( $\times 100$  o  $\times 200$ ) 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 (Gutierrez *et al.*, 2004a; Reid *et al.*, 2001; Sachs, 1984). Además, pueden aplicarse grandes cantidades de sangre o de capa leucocitaria a columnas grandes para preparar antígeno para la prueba de la inmunofluorescencia indirecta (IFAT), la prueba de la aglutinación en tarjeta (CATT) o el enzoinmunoanálisis (ELISA).

### 1.3. Inoculación en animales

Debido a la creciente preocupación por eliminar el uso de animales para las pruebas biológicas, la inoculación en animales debe limitarse al máximo 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 se utilizan con frecuencia 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 (Reid *et al.*, 2001). Esta técnica es adecuada cuando se precisa una detección muy sensible.

Se inyecta 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 cada 48 horas para detectar la parasitemia. El período de incubación, antes de la aparición de los parásitos y de su patogenicidad, depende de la cepa de los tripanosomas, de su concentración en el inóculo y de la estirpe de animal de laboratorio utilizada; sin embargo, en la mayoría de los casos es muy corto ( $5 \pm 2$  días), aunque en casos muy infrecuentes 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 han utilizado compuestos como ciclofosfamida o acetato de hidrocortisona, la irradiación con rayos X o la esplenectomía. Esta intervención solo está justificada cuando es sumamente importante detectar un hospedador potencialmente infectado (por ejemplo, en el caso de una importación a una zona libre de la enfermedad).

### 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, 1997b).

#### 1.4.1. Sondas de ADN

Se han utilizado sondas de ADN específicas para detectar ADN de tripanosomas en sangre o tejidos infectados, pero no se utilizan sistemáticamente porque hay que evaluarlas mejor (Basagoudanavar *et al.*, 2001; Reid *et al.*, 2001; Viseshakul & Panyim, 1990). En general, se prefieren las técnicas de PCR, y en algunos laboratorios se utilizan de forma sistemática.

#### 1.4.2. 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 NRP o TBR (Masiga *et al.*, 1992; Moser *et al.*, 1989). Se han publicado otros cebadores y se están evaluando; algunos de estos son específicos de *Trypanozoon* (Desquesnes *et al.*, 2001; Holland *et al.*, 2001; Wuyts *et al.*, 1994) y otros, de *T. evansi* ± *T. equiperdum* (Artama *et al.*, 1992; Claes *et al.*, 2004; Panyim *et al.*, 1993) (la evaluación de los últimos es muy difícil debido a la falta de obtención de cepas de referencia). 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, por ejemplo en zonas y en hospedadores potencialmente infectados con otros *Trypanozoon*, como *T. brucei brucei*, se puede conseguir la confirmación de especie con cebadores más específicos, como TEPAN (Panyim *et al.*, 1993) o TE2249/2250 (Artama *et al.*, 1992). Se están desarrollando otros cebadores específicos de cepas RoTat (Claes *et al.*, 2004; Verloo *et al.*, 2001) y de cepas no RoTat (Ngaira *et al.*, 2005), así como otras técnicas, como la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (Thekiso *et al.*, 2005) y Taqman (Taylor *et al.*, 2008), pero deben evaluarse mejor y todavía no están validadas.

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; Majiwa *et al.*, 1994). Existen varias técnicas clásicas, como la preparación de Chelex (Solano *et al.*, 1999), kits comerciales y la preparación con fenol-cloroformo (Maciel *et al.*, 2009). También puede utilizarse sangre conservada en alcohol al 70% en una proporción 1/1, o sobre papel de filtro seco (Desquesnes, 2004; Holland *et al.*, 2002; Omanwar *et al.*, 1999).

La sensibilidad de la PCR, al depender de la cantidad de ADN disponible, 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 permite detectar incluso 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 (Konnai *et al.*, 2009).

La PCR ofrece la sensibilidad y la especificidad que se requieren para la detección de la infección por tripanosomas (Masiga *et al.*, 1992; Wuyts *et al.*, 1994; 1995), 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 (Bengaly *et al.*, 2001), 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.

### 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

Históricamente, se han utilizado varios métodos para detectar anticuerpos inespecíficos presentes en casos de infección por surra. Estos métodos son pruebas bioquímicas como la floculación, la formación de gel con formol, la precipitación con cloruro mercúrico y las pruebas de turbidez con timol, y se consideran obsoletas, aunque la prueba del formol puede seguir teniendo cierta utilidad en el campo, ya que es sencilla de llevar a cabo. Todas estas pruebas dependen de un aumento en las globulinas séricas como consecuencia de la infección, pero este aumento no es específico de la infección por *T. evansi*. El cloruro mercúrico no debe utilizarse, dada su toxicidad. En cuanto a la prueba de la formación de gel con formol, es la de elección en camellos, pero no se ha validado en ninguna otra especie. Se lleva a cabo añadiendo dos gotas de solución concentrada de formalina (40% de formaldehído [p/v]) a 1 ml de suero. La prueba es positiva si el suero se coagula inmediatamente y se vuelve blanco. En reacciones negativas, el suero permanece inalterado, o bien la coagulación puede tardar hasta 30 minutos en aparecer.

De forma similar, se han utilizado muchos métodos distintos para detectar anticuerpos humorales específicos contra antígenos de tripanosoma, como las pruebas de aglutinación directa o indirecta, la fijación del complemento (CF), la IFAT (Desquesnes, 1997a; Uilenberg, 1998) y la tripanolisis. La IFAT sigue siendo útil para los estudios a pequeña escala. La prueba de la tripanolisis se utiliza para la confirmación individual de positividad, debido a su alta especificidad. Las otras pruebas ya no se utilizan, puesto que recientemente se han sustituido por técnicas más fáciles de estandarizar, concretamente ELISA (Davison *et al.*, 1999; Franke *et al.*, 1994; Rae *et al.*, 1989; Reid & Copeman, 2002; 2003; Tuntasuvan *et al.*, 1996) y CATT (Bajyana Songa & Hamers, 1988; Njiru *et al.*, 2004). Los intentos de desarrollar nuevas técnicas, como las pruebas de aglutinación en látex, hasta ahora no han tenido éxito (Gutierrez *et al.*, 2004b; Holland *et al.*, 2005; Morzaria *et al.*, 1996).

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; Diall *et al.*, 1994; Holland *et al.*, 2005; Payne *et al.* 1991; Reid & Copeman, 2003; Verloo *et al.*, 2000). 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 (Holland *et al.*, 2002; 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, 1997c). También es necesario tener en cuenta las distintas especies de *Trypanosoma* y sus cepas (cepas RoTat frente a cepas no RoTat, por ejemplo) presentes en una zona dada.

## 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $37^{\circ}\text{C}$  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  $4^{\circ}\text{C}$  y renovarse cada 2 semanas.

El conjugado de fluoresceína debe guardarse a  $-20^{\circ}\text{C}$  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) monoespecíficos dan los resultados más específicos.

La seroconversión frente a *T. evansi* según la IFAT puede tardar 60 a 90 días (Jacquiet *et al.*, 1993). En comparación con la CATT, la IFAT es más sensible, probablemente porque permite detectar animales parasitéticos, pero la especificidad es más baja (Dia *et al.*, 1997b). En los casos dudosos, la interpretación es subjetiva y a veces se ha cuestionado la reproducibilidad (Ferenc *et al.*, 1990). Por estos motivos, el ELISA es una técnica más aconsejable.



## 2.2. Enzimoimmunoanálisis (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 proteasa<sup>3</sup> 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 14.000 *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 (Warburg & Christian, 1942). El antígeno soluble así obtenido se puede guardar en pequeñas alícuotas a -80°C durante varios meses. También se puede liofilizar y mantener a -20°C. El recubrimiento de la placa de ELISA en general se lleva a cabo con una concentración de proteína de 5 µg/ml en tampón de recubrimiento.

### 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. Para este paso, las inmunoplasmas que garantizan que se conservan las actividades específicas de los epítomos durante la unión a la superficie de la placa<sup>4</sup> son preferibles a otras placas que podrían permitir que se perdiera la claridad de los epítomos o que estos se alteraran debido a las características de la unión.
- 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 crucial<sup>5</sup>; 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 seroalbúmina bovina.
- iii) Se añaden diluciones del suero problema en BB (100 µl), por duplicado o por triplicado. Se incluyen sueros control negativo y positivo. Las diluciones deben determinarse empíricamente y suelen estar entre 1/100 y 1/200. 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 elimina el contenido y se lavan tres veces con tampón de lavado.
- 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 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [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 a temperatura ambiente durante 20–30 minutos.

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

4 Por ejemplo: las inmunoplasmas Polysorp Nunc®

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

- 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 altos y medios, tres sueros control negativos bajos y medios, y un control tampón. Los resultados se expresan en porcentaje relativo de positividad según las densidades ópticas de las muestras control (Desquesnes, 1997c; Desquesnes *et al.*, 2009).

Existe una amplia variedad de procedimientos analíticos, por ejemplo, utilizando antígeno nativo purificado (Verloo *et al.*, 1998) 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, 1997c). Es probable que estos resultados muestren cierto solapamiento. El operario puede elegir el punto más adecuado para modificar los falsos positivos o 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 (Greiner *et al.*, 1994). 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) (Holland *et al.*, 2002; Verloo *et al.*, 2000); se pueden consultar los protocolos 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 inter-laboratorial.

Las VSG podrían ser demasiado específicas como para ser utilizadas como antígenos en una prueba universal (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 (Laha & Sasmal, 2008); 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 500-1.000 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*. En esta prueba se utilizan tripanosomas fijados y teñidos de un VAT definido conocido como RoTat 1.2. En la reacción de aglutinación intervienen antígenos de superficie, tanto variables como constantes. En el Laboratorio de Referencia de la OIE del ITM se dispone del kit comercial de la CATT. Consta de parásitos ("antígeno") liofilizados, PBS, pH 7,4, tarjetas recubiertas de plástico, espátulas, sueros control positivos y negativos 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 sobre los círculos de las tarjetas plastificadas. 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 a analizar. 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, de unos 0,5 €/prueba, y un técnico puede llevar a cabo unas 200 pruebas al día.

Dado que la CATT detecta principalmente IgM (inmunoglobulinas pentavalentes aglutinantes de semivida corta), es adecuada para la detección de infecciones tempranas o tardías con una circulación reciente de parásitos en la sangre, y permite detectar infecciones activas con un alto valor predictivo positivo. La CATT es más probable que clasifique correctamente animales verdaderamente infectados, de modo que puede utilizarse para detectar animales concretos con el fin de tratarlos con fármacos tripanocidas.

Actualmente se está evaluando un formato de prueba alternativo (LATEX/*T.evansi*) en el que se utilizan perlas de látex recubiertas con VSG de RoTat 1.2 nativo.

## 2.4. Prueba de la inmunotripanolisis

La prueba de la inmunotripanolisis detecta anticuerpos "tripanolíticos" 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 el crecimiento de tripanosomas en roedores y, por tanto, es cara. 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 muy alto (250 €/prueba).

## 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 hospedadora o de la zona geográfica en la que se encuentra el hospedador. Hasta ahora, no existen ninguna prueba (parasitológica, serológica ni molecular) capaz de distinguir *T. evansi* de las otras especies o subespecies de *Trypanozoon*. El diagnóstico final de la surra se basa en una información epizootológica y en los resultados de laboratorio y observaciones. Por estos motivos, actualmente se recomiendan varias de estas combinaciones analíticas adaptadas a las distintas circunstancias relevantes para un hospedador determinado. Existen directrices que deberían contribuir a lograr los diagnósticos correctos.

### 3.1. Métodos recomendados

- 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, 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, debe utilizarse HCT o BCM para aumentar la sensibilidad.
- ii) PCR-TBR: Debe prepararse ADN a partir de sangre con un kit comercial 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.
- 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  $>$  al valor de corte establecido para la especie hospedadora (existen conjugados definidos como apropiados para cada especie; véase el apartado (d) abajo).
- 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).

### 3.2. Équidos

Un équido no presenta infestación por surra si da un resultado negativo en el ELISA para *T. evansi* (anti molécula entera de IgG de caballo), en la CATT para *T. evansi*, en la PCR-TBR y en el examen microscópico.

Un animal se considera infectado por *Trypanozoon* spp. si da un resultado positivo en la PCR-TBR y/o si se observan parásitos *Trypanozoon* al examen microscópico.

Un animal se considera seropositivo a surra si es positivo en el ELISA para *T. evansi* y/o en la CATT para *T. evansi*; en este caso, se le debe realizar la prueba de la CF para durina, y si da positivo en esta, también se considerará seropositivo a durina; si en la CF para durina da un resultado negativo, se considerará seropositivo solo para surra.

### 3.3. Camélidos

Un animal no presenta infestación por surra si da un resultado negativo en el ELISA para *T. evansi* (conjugado de proteína A), en la CATT para *T. evansi*, en la PCR-TBR y en el examen microscópico.

Un animal se considera infectado por *Trypanozoon* spp. si da un resultado positivo en la PCR-TBR y/o en el examen microscópico.

Un animal se considera seropositivo a surra si da un resultado positivo en el ELISA para *T. evansi* y/o en la CATT/*T. evansi*.

### 3.4. Otras especies hospedadoras

Un animal no presenta infestación por surra si da un resultado negativo en el ELISA para *T. evansi* (conjugado de proteína A), en la CATT para *T. evansi*, en la PCR-TBR y en el examen microscópico.

Un animal se considera infectado por *Trypanozoon* spp. si da un resultado positivo en la PCR-TBR y/o en el examen microscópico.

Un animal se considera seropositivo a surra si da un resultado positivo en el ELISA para *T. evansi* y/o en la CATT para *T. evansi*.

Conjugados a utilizar para cada especie hospedadora: Ganado bovino y búfalos: conjugado anti-molécula entera de IgG bovina; cerdos y elefantes: conjugado anti-proteína G; camellos: conjugado anti-proteína A; rata: conjugado anti-molécula entera de IgG de rata. En otras especies todavía no se han definido los conjugados.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

No existen vacunas para esta enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

ARTAMA W.T., AGEY M.W. & DONELSON J.E. (1992). DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitology*, **104**, 67–74.

BASAGOUDANAVAR S.H., RAO J.R., OMANAWAR S., TIWARI A.K., SINGH R.K., KARTARIA R.S. & BUTCHIAH G. (2001). Identification of *Trypanosoma evansi* by DNA hybridisation using a non-radioactive probe generated by arbitrary primer PCR. *Acta Vet. Hung.*, **49**, 191–195.

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.

BENGALY Z., KASBARI M., DESQUESNES M. & SIDIBE I (2001). Validation of a polymerase chain reaction assay for monitoring the therapeutic efficacy of diminazene aceturate in trypanosome-infected sheep. *Vet. Parasitol.*, **96**, 101–113.

- BRUN R., HECKER H. & LUN Z.R. (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.*, **79**, 95–107.
- CLAES F., AGBO E.C., RADWANSKA M., TE PAS M.F.W., BALTZ T., DE WAAL D.T., GODDEERIS B.M., CLASSEN E. & BUSCHER P. (2003). How does *Trypanosoma equiperdum* fit into the *Trypanozoon* group? A cluster analysis by RAPD and multiplex-endonuclease genotyping approach. *Parasitology*, **26**, 425–431
- CLAES F., BUSCHER P., TOURATIER L. & GODDEERIS B.M. (2005). *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? *Trends Parasitol.*, **21**, 316–321.
- CLAES F., RADWANSKA M., URAKAWA T., MAJWA 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.
- DARGANTES A.P., REID S.A. & COPEMAN D.B. (2005a). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. I Clinical signs and pathology. *J. Comp. Pathol.*, **133**, 261–266.
- DARGANTES A.P., REID S.A. & COPEMAN D.B. (2005b). Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. II Pathology. *J. Comp. Pathol.*, **133**, 267–276.
- DAVISON H.C., THRUSFIELD M.V., MUHARSINI S., HUSEIN A., PARTOUTOMO S., MASAKE R. & LUCKINS A.G. (1999). Evaluation of antigen- and antibody-detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epidemiol. Infect.*, **123**, 149–155.
- DESQUESNES M. (1996). Evaluation of three antigen detection tests (monoclonal trapping ELISA) for African trypanosomes, with an isolate of *T. vivax* from French Guyana. *Ann. NY Acad. Sci.*, **791**, 172–184.
- DESQUESNES M. (1997a). Les trypanosomoses du bétail en Amérique Latine, étude spéciale dans le Plateau des Guyanes. PhD Thesis, Lille II University, 26 septembre 1997, Lille, France, 409 p.
- DESQUESNES M. (1997b). Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme linked immunosorbent assay (Ag-ELISA). *Acta Trop.*, **65**, 139–148.
- DESQUESNES M. (1997c). Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques: méthode, intérêts et limites. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **16**, 809–823.
- 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. & 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., MCLAUGHLIN G., ZOUNGRANA A. & DÁVILA A.M.R. (2001). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 610–614.
- DESQUESNES M., MICHEL J.F., DE LA ROCQUE S., SOLANO P., MILLOGO L., BENGALY Z. & SIDIBE I. (1999). Enquête parasitologique et sérologique (ELISA-indirectes) sur les trypanosomoses des bovins dans la zone de Sidéradougou, Burkina Faso. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **52**, 3–4.
- DESQUESNES M. & TRESSE L. (1996). Evaluation de la sensibilité du test de WOO pour la détection de *Trypanosoma vivax*. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, 1996. **49**, 315–321.
- DIA M.L., DIOP, C., AMINETOU M., JACQUIET P. & THIAM A. (1997). Some factors affecting the prevalence of *T. evansi* in camels in Mauritania. *Vet. Parasitol.*, **72**, 111–120.

- DIA M.L., VAN MEIRVENNE N., MAGNUS E., LUCKINS A.G., DIOP C., THIAM A., JACQUIET P. & HAMERS R. (1997). Evaluation de 4 tests de diagnostic: Frottis sanguins, CATT, IFI et ELISA-Ag dans l'étude de l'épidémiologie de la trypanosomose cameline à *Trypanosoma evansi* en Mauritanie. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **50**, 29–36.
- DIALLO O., BAJYANA SONGA E., MAGNUS E., KOUYATE B., DIALLO B., VAN MEIRVENNE N. & HAMERS R. (1994). Evaluation of a direct serologic card agglutination test for the diagnosis of camel trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. *Rev. Sci. Tech.*, **13**, 793–800.
- FERENC S.A., STOPINSKI V. & COURTENEY C.H. (1990). The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey in the eastern Caribbean basin. *Int. J. Parasitol.*, **20**, 51–56.
- FRANKE C.R., GREINER M. & MEHLITZ D. (1994). Investigations on naturally occurring *Trypanosoma evansi* infections in horses, cattle, dogs and capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in Pantanal de Pocone (Mato Grosso, Brazil). *Acta Trop.*, **58**, 159–169.
- GILL B.S. (1977). Trypanosomes and trypanosomiasis of Indian livestock. Indian Council of Agricultural Research, Edit. ICAR New Delhi, 1977, A booklet, 137 p.
- GREINER M., FRANKE C.R., BOHNING D. & SCHLATTMANN P. (1994). Construction of an intrinsic cut off value for the sero-epidemiological study of *Trypanosoma evansi* infections in a canine population in Brazil: a new approach toward an unbiased estimation of prevalence. *Acta Trop.*, **56**, 97–109.
- GUTIERREZ C., CORBERA J.A., DORESTE F. & BUSCHER P. (2004a). Use of the miniature anion exchange centrifugation technique to isolate *Trypanosoma evansi* from goats. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1026**, 149–151.
- 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.
- GUTIERREZ C., CORBERA J.A., MORALES M. & BUSCHER P. (2004b). Performance of serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally inoculated goats. *Ann. NY Acad. Sci.*, **1026**, 152–153.
- HOLLAND W.G., CLAES F., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSSSE 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. & VERCRUYSSSE 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.
- HOLLAND W.G., THANH N.G., MY L.N., MAGNUS E., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSSSE J. (2002). Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper discs in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Trop.*, **81**, 159–165.
- 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 epidemiological surveys of tsetse-transmitted trypanosomiasis in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **37**, 91–99.
- JACQUIET P., CHEILH D., THIAM A. & DIA M.L. (1993). La trypanosomose à *Trypanosoma evansi* (Steel 1985), Balbiani 1988, chez les ruminants de Mauritanie. Résultats d'inoculations expérimentales et d'enquêtes sur le terrain. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **46**, 574–578.
- JENSEN R.E., SIMPSON L. & ENGLUND P.T. (2008). What happens when *Trypanosoma brucei* leaves Africa. *Trends Parasitol.*, **24**, 428–431.
- KONNAI S., MEKATA M., MINGALA C., ABES N., GUTIERREZ C., HERRERA J., DARGANTES A., WITOLA W., CRUZ L., INOUE N., ONUMA M. & OHASHI K. (2009). Development and application of a quantitative real-time PCR for the diagnosis of Surra in water buffaloes. *Infect. Genet. Evol.*, **4**, 449–452.
- LAHA R. & SASMAL N.K. (2008). Characterization of immunogenic proteins of *Trypanosoma evansi* isolated from three different Indian hosts using hyperimmune sera and immune sera. *Res. Vet. Sci.*, **85**, 534–539.

- 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.
- LOHR K.F., PHOLPARK S., SIRIWAN P., LEESIRIKUL N., SRIKITJAKARN & STAACK C. (1986). *Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in North-East Thailand. II. Abortions. *Trop. Anim. Health Prod.*, **18**, 103–108.
- LUMSDEN W., KIMBER C., DUKES P., HALLER L., STANGHELLINI A. & DUVALLET G. (1981). Field diagnosis of sleeping sickness in Ivory Coast 1. Comparison of the miniature anion-exchange centrifugation technique with other protozoological methods. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 242–250.
- MACIEL B.M., SANTOS A.C., DIAS J.C., VIDAL R.O., DIAS R.J., GROSS E., CASCARDO J.C. & REZENDE R.P. (2009). Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. *Genet. Mol. Res.*, **8**, 375–388.
- MAJIWA P.A.O., THATTHI R., MOLOO S.K., NYEKO J.P.H., OTIENO L.H. & MALOO S. (1994). Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy coat samples from antigenaemic but aparasitaemic cattle. *Parasitology*, **108**, 1–10.
- 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. (2006). Characterisation of a monoclonal antibody against *Trypanosoma evansi* and its application for detecting circulating antibodies. *Rev. Sci. Tech.*, **25**, 1067–1074.
- 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.
- MORZARIA S., MASAKE R., ROWLAND J. & MUSOKE T. (1996). Antigen ELISAs for trypanosomes; evaluation of the performance. Proceedings of a Workshop held at ILRI, Nairobi, Kenya, 9–11 December 1996, 129 p.
- MOSER D.R., COOK G.A., OCHS D.E., BAILEY C.P., MCKANE M.R. & DONELSON J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, **99**, 57–66.
- NGAIRA J.M., OLEMO 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., 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.
- OMANWAR S., RAO J.R., BASAGOUDANAVAR S.H., SINGH R.K. & BUTCHAI G. (1999). A simple and highly sensitive method to detect *Trypanosoma evansi* by DNA amplification from crude blood samples collected on filter papers. *J. Vet. Parasitol.*, **13**, 27–29.
- ONAH D.N., HOPKINS J.A. & LUCKINS A.G. (1998). Increase in CD5<sup>+</sup> B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **63**, 209–222.
- 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.
- PAYNE R.C., SUKANTO I.P., DJAUHARI D., PARTOUTOMO S., WILSON A.J., JONES T.W., BOID R. & LUCKINS A.G. (1991). *Trypanosoma evansi* infection in cattle, buffaloes and horses in Indonesia. *Vet. Parasitol.*, **38**, 109–119.
- 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.

- RAE P.F., THRUSFIELD M.V., HIGGINS A., AITKEN C.G.G., JONES T.W. & LUCKINS A.G. (1989). Evaluation of enzyme immunoassays in the diagnosis of camel (*Camelus dromedarius*) trypanosomiasis: a preliminary investigation. *Epidemiol. Infect.*, **102**, 297–307.
- REID S.A. & COPEMAN D.B. (2002). Evaluation of an antibody–ELISA using five crude antigen preparations for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*, **104**, 79–84.
- 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.
- REID S.A., HUSEIN A. & COPEMAN D.B. (2001). Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. *Vet. Parasitol.*, **102**, 291–297.
- SACHS R. (1984). Improvements in the miniature anion exchange centrifugation technique for detecting trypanosomes in domestic pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **78**, 561.
- SOLANO P., MICHEL J.F., LEFRANÇOIS T., DE LA ROCQUE S., SIDIBE I., ZOUNGRANA A. & CUISANCE D. (1999). Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Vet. Parasitol.*, **86**, 95–103.
- TAYLOR T.K., BOYLE D.B. & BINGHAM J. (2008). Development of a TaqMan PCR assay for the detection of *Trypanosoma evansi*, the agent of surra. *Vet. Parasitol.*, **153**, 255–264.
- 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.
- TUNTASUVAN D., CHOMPOOCHAN T., VONGPAKORN M. & MOHKAEW K. (1996). Detection of *Trypanosoma evansi* antibodies in pigs using an enzyme linked immunosorbent assay. *J. Thai Vet. Med. Assoc.*, **47**, 45–53.
- UILENBERG G. (1998). A field guide for the diagnosis treatment and prevention of African animal trypanosomosis. FAO, Rome, Italy, 158 p.
- 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.
- 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., HOLLAND W., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., GODDEERIS B., VERCRUYSSSE J. & BUSCHER P. (2000). Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Vet. Parasitol.*, **92**, 87–96.
- 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.
- VERLOO D., TIBAYRENC R., MAGNUS E., BÜSCHER P. & VAN MEIRVENNE N. (1998). Performance of serological tests for *Trypanosoma evansi* infections in camels from Niger. *J. Protozool. Res.*, **8**, 190–193.
- VISESHAKUL N. & PANYIM S. (1990). Specific DNA probe for the sensitive detection of *Trypanosoma evansi*. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **21**, 21–27.
- WARBURG O. & CHRISTIAN W. (1942). Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.*, **310**, 384–421.
- WUYTS N., CHODESAJJAWATEE N. & PANYIM S. (1994). A simplified and highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* by DNA amplification. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, **25**, 266–271.
- WUYTS N., CHOKESAJJAWATEE N., SARATAPHAN N. & PANYIM S. (1995). PCR amplification of crude blood on microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma evansi* in dairy cattle. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, **75**, 229–237.



ZABLOTSKIJ 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  
(puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestres* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).  
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 (*T. EVANSI*):  
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2012.