



**D. MIGUEL BATISTA ARTEAGA, SECRETARIO DEL  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN  
ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS  
ALIMENTOS DE LA UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN  
CANARIA,**

**CERTIFICA,**

Que el Consejo de Doctores del Departamento toma el acuerdo de dar el consentimiento para su tramitación a la tesis doctoral titulada "Epidemiología clínica y molecular de la tripanosomosis animal por *Trypanosoma evansi* en Canarias" presentada por el doctorando D. Noé F. Rodríguez González y dirigida por los Dres. D. Carlos J. Gutiérrez Cabrera, D.<sup>a</sup> María Teresa Tejedor Junco y D.<sup>a</sup> Margarita González Martín.

Y para que así conste, y a efectos de lo previsto en el artº 5 del Reglamento para la Elaboración, Tribunal, Defensa y Evaluación de Tesis Doctorales de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, firmo la presente en Arucas, a 23 de noviembre de dos mil once.



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CLÍNICA E INVESTIGACIÓN  
TERAPÉUTICA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN  
ANIMAL, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

TESIS DOCTORAL

**“Epidemiología clínica y molecular de la  
tripanosomosis animal por *Trypanosoma evansi*  
en Canarias”**

**Doctorando**

Noé F. Rodríguez González

**Directores**

Carlos J. Gutiérrez Cabrera

M<sup>a</sup> Teresa Tejedor Junco

Margarita González Martín

**Las Palmas de Gran Canaria, a 9 de noviembre 2011**



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS  
DE GRAN CANARIA

**Carlos J. Gutiérrez Cabrera**, Profesor Titular del Área de conocimiento de Medicina y Cirugía Animal del Departamento de Patología Animal, Producción Animal y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, y

**M<sup>a</sup> Teresa Tejedor Junco y Margarita González Martín**, Profesoras Titulares del Área de conocimiento de Microbiología del Departamento de Ciencias Clínicas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

**INFORMAN:**

Que D. Noé F. Rodríguez González, Licenciado en Veterinaria por la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, ha realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento el presente trabajo de tesis doctoral titulado:

**“Epidemiología clínica y molecular de la tripanosomosis animal por *Trypanosoma evansi* en Canarias”**

El cual reúne las condiciones exigidas por la legislación vigente para su presentación con el fin de optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmamos en Arucas (Las Palmas) a 9 de noviembre de 2011.

Fdo. Dr. Carlos J. Gutiérrez Cabrera

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> Teresa Tejedor Junco

Fdo. Dra. Margarita González Martín

*“Ninguna fuerza abatirá tus sueños, porque ellos se nutren con su propia luz. Se alimentan de su propia pasión. Renacen cada día para ser”*

Atahualpa Yupanqui

*A mi abuelo Pedro.*

*A mis padres.*

*A mi hermana.*

*Al resto de mi familia y a esos familiares con los que no comparto sangre, pero sí el músculo que la bombea, mis amigos.*

*A todos ellos, porque conocen el sacrificio que ha supuesto este camino, por ser el aliento para seguir luchando y porque me permiten definirme como la persona que soy, no más que una amalgama de vivencias compartidas.*

## Abreviaturas de uso común:

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNk	Acido desoxirribonucleico kinetoplástico
Ag-ELISA	Enzimainmunoensayo para detección de antígenos
BCM	Método de la capa leucocitaria
CATT/ <i>T. evansi</i>	Test de aglutinación sobre tarjeta para <i>Trypanosoma evansi</i> .
ELISA	Enzimainmunoensayo
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG- ELISA	Enzimainmunoensayo para detección de inmunoglobulinas G.
MHCT	Método de concentración del microhematocrito o técnica de Woo
OIE	Organización Internacional de Epizootias
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RoTat 1.2	Rode Trypanozoon antigen type 1.2
VCM	Volumen corpuscular medio
VSG	Glicoproteínas variables de superficie

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN</b>	1
<b>II. OBJETIVOS</b>	11
<b>III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	15
<b>1. HISTORIA Y EVOLUCIÓN DE <i>Trypanosoma evansi</i></b>	17
1.1. Historia del término <i>Trypanosoma evansi</i> : sinonimias	17
1.2. Historia del término “surra”: sinonimias	18
1.3. Evolución de <i>Trypanosoma evansi</i>	19
1.4. Distribución geográfica de <i>Trypanosoma evansi</i>	20
1.5. Reseñas históricas de los camellos ( <i>Camelus dromedarius</i> ) en Canarias.	22
1.6. Situación actual de la surra desde la óptica del comercio internacional de animales	24
1.7. Situación actual de <i>Trypanosoma evansi</i> desde la óptica de la salud pública: potencial zoonótico	25
<b>2. TAXONOMÍA DE <i>Trypanosoma evansi</i></b>	27
2.1. Sistemática tradicional de <i>Trypanosoma spp.</i>	27
2.2. Sistemática actual de <i>Trypanosoma spp.</i>	27
2.3. Clasificación de los tripanosomas de importancia veterinaria y médica que afectan a mamíferos	29
<b>3. MORFOLOGÍA DE <i>Trypanosoma evansi</i></b>	31
3.1. Generalidades	31
3.2. Flagelo	31
3.3. Periplasto y envoltura de glicoproteínas	32
3.4. Citoesqueleto	33
3.5. Citoplasma	33
<b>4. CICLO DE <i>Trypanosoma evansi</i></b>	36

<b>4.1. Formas de transmisión de <i>Trypanosoma evansi</i></b>	36
4.1.1. Transmisión por picadura de vectores mecánicos	36
4.1.2. Transmisión por mordedura por <i>Desmodus rotundus</i>	37
4.1.3. Transmisión vía oral	37
4.1.4. Transmisión iatrogénica	38
4.1.5. Transmisión vertical	38
4.1.5.1. <i>Transmisión transplacentaria</i>	38
4.1.5.2. <i>Transmisión lactógena</i>	39
<b>4.2. Insectos vectores principales de <i>Trypanosoma evansi</i>. Situación en Canarias</b>	39
4.2.1. Géneros <i>Tabanus</i> y <i>Atylotus</i>	39
4.2.2. Género <i>Stomoxys</i>	42
4.2.3. Género <i>Haematobia (Lyperosia)</i>	44
<b>4.3. Papel de otros insectos en la epidemiología de <i>Trypanosoma evansi</i></b>	45
4.3.1. Género <i>Hippobosca</i>	45
4.3.2. Otros insectos	46
<b>4.4. Animales hospedadores potenciales de <i>Trypanosoma evansi</i></b>	46
<b>5. PATOLOGÍA DE LA INFESTACIÓN POR <i>Trypanosoma evansi</i></b>	51
<b>5.1. Manifestaciones clínicas</b>	51
5.1.1. Generalidades	51
5.1.2. Manifestaciones clínicas en camélidos	52
5.1.3. Manifestaciones clínicas en equinos	53
5.1.4. Manifestaciones clínicas en especies rumiantes ganaderas	54
5.1.5. Manifestaciones clínicas en carnívoros domésticos	56

	Índice	
5.1.6.	Manifestaciones clínicas en otras especies animales	56
5.1.7.	Confusiones clínicas con otros tripanosomas patógenos distintos de <i>T. evansi</i>	59
5.1.7.1.	<i>Trypanosoma lewisi</i>	59
5.1.7.2.	<i>Trypanosoma theileri</i>	59
5.1.7.3.	<i>Trypanosoma vivax</i>	60
5.1.7.4.	<i>Trypanosoma equiperdum</i>	60
5.1.7.5.	<i>Trypanosoma spp. con estrictas especificidades geográficas</i>	60
<b>5.2.</b>	<b>Hallazgos laboratoriales</b>	<b>61</b>
5.2.1.	Hematología	61
5.2.1.1.	<i>Hematología. Alteraciones de la serie roja</i>	61
5.2.1.1.1.	<i>Camélidos</i>	61
5.2.1.1.2.	<i>Equinos</i>	62
5.2.1.1.3.	<i>Carnívoros domésticos</i>	63
5.2.1.1.4.	<i>Especies rumiantes ganaderas</i>	64
5.2.1.2.	<i>Hematología: Alteraciones de la serie blanca</i>	64
5.2.1.2.1.	<i>Camélidos</i>	65
5.2.1.2.2.	<i>Equinos</i>	65
5.2.1.2.3.	<i>Carnívoros domésticos</i>	65
5.2.1.2.4.	<i>Especies rumiantes ganaderas</i>	66
5.2.2.	Alteraciones bioquímicas	67
5.2.2.1.	<i>Proteínas séricas totales: Albumina y globulinas</i>	67
5.2.2.2.	<i>Enzimas</i>	68
5.2.2.3.	<i>Bilirrubina, índice icterico</i>	69

	Índice	
5.2.2.4.	<i>Urea y Creatinina</i>	69
5.2.2.5.	<i>Macro y microminerales</i>	70
5.2.2.6.	<i>Glucosa</i>	70
5.2.2.7.	<i>Parámetros lipídicos</i>	70
<b>5.3.</b>	<b>Anatomía patológica</b>	<b>71</b>
5.3.1.	Hallazgos macroscópicos	71
5.3.2.	Hallazgos microscópicos	73
5.3.2.1.	<i>Piel</i>	73
5.3.2.2.	<i>Sistema nervioso</i>	73
5.3.2.3.	<i>Ojo</i>	74
5.3.2.4.	<i>Bazo y ganglios linfáticos</i>	74
5.3.2.5.	<i>Médula ósea</i>	75
5.3.2.6.	<i>Musculatura esquelética y cardíaca</i>	75
5.3.2.7.	<i>Pulmón</i>	75
5.3.2.8.	<i>Hígado</i>	76
5.3.2.9.	<i>Riñón</i>	76
5.3.2.10.	<i>Glándulas adrenales.</i>	77
5.3.2.11.	<i>Intestino</i>	77
5.3.2.12.	<i>Aparato reproductivo</i>	78
<b>5.4.</b>	<b>Patogénesis</b>	<b>78</b>
5.4.1.	Generalidades	78
5.4.2.	Formación inicial del chancro e implicación en la patogenia	79
5.4.3.	<i>Parasitemia y fiebre intermitentes. Consecuencias</i>	80

	Índice
5.4.4. Período de prepatencia	81
5.4.5. Patogenia de la anemia. Consecuencias	82
5.4.6. Patogenia del edema	84
5.4.7. Invasión del sistema nervioso central y alteraciones neurológicas	85
5.4.8. Respuesta inmunitaria. Inmunodepresión	86
5.4.8.1. <i>Respuesta inmunitaria celular</i>	87
5.4.8.2. <i>Respuesta inmunitaria humoral</i>	89
5.4.8.2.1. <i>Anticuerpos</i>	89
5.4.8.2.2. <i>Sistema del complemento</i>	90
5.4.9. Desórdenes hormonales	91
<b>6. DIAGNÓSTICO DE LA TRIPANOSOMOSIS POR <i>Trypanosoma evansi</i></b>	<b>93</b>
<b>6.1. Métodos de identificación del agente</b>	<b>94</b>
6.1.1. Examen directo al microscopio	94
6.1.1.1. <i>Gota gruesa</i>	94
6.1.1.2. <i>Tinción de frotis denso</i>	95
6.1.1.3. <i>Tinción de frotis fino</i>	95
6.1.2. Métodos de concentración	96
6.1.2.1. <i>Técnica de Woo</i>	96
6.1.2.2. <i>Técnica de Murray</i>	99
6.1.2.3. <i>Técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación</i>	100
6.1.3. Inoculación en animales	101
6.1.4. Detección de ADN tripanosómico	102

	Índice
6.1.4.1.	<i>PCR convencional</i> 102
6.1.4.2.	<i>Sondas de ADN recombinante</i> 107
6.1.4.3.	<i>PCR cuantitativa</i> 107
6.1.4.4.	<i>Amplificación isotérmica tipo LAMP</i> 108
6.1.5.	Detección antigénica 109
<b>6.2.</b>	<b>Métodos serológicos</b> 110
6.2.4.	Inmunofluorescencia indirecta (IFI) 111
6.2.5.	Enzima inmunoensayo (ELISA indirecto o IgG-ELISA) 112
6.2.6.	Pruebas de aglutinación en tarjeta (CATT/ <i>T. evansi</i> y LATEX/ <i>T. evansi</i> ) 115
6.2.6.4.	CATT/ <i>T. evansi</i> 115
6.2.6.5.	LATEX/ <i>T. evansi</i> 118
6.2.7.	Prueba de inmunotripanolisis (ITL) 119
<b>7.</b>	<b>MEDIDAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD</b> 121
<b>7.1.</b>	<b>Quimioterapia actual frente a la surra</b> 121
7.1.4.	Diamidinas aromáticas 122
7.1.5.	Suramina sódica 126
7.1.6.	Derivados de la acridina 128
7.1.7.	Arsenicales 130
<b>7.2.</b>	<b>Medidas preventivas frente a la surra</b> 133
7.2.1.	Inmunización frente a <i>Trypanosoma evansi</i> 133
7.2.2.	Inmunización frente a vectores transmisores de <i>Trypanosoma evansi</i> 133
7.2.3.	“Quimioterapia Curativa” frente a “Quimioterapia Preventiva” 134
7.2.4.	Vigilancia fronteriza en áreas libres de la enfermedad 135

	Índice
7.2.5. Educación en prevención de la enfermedad	136
7.2.6. Control sobre los vectores transmisores de <i>Trypanosoma evansi</i>	137
7.2.6.1. <i>Control sobre Desmodus rotundus</i>	137
7.2.6.2. <i>Control sobre insectos vectores de Trypanosoma evansi</i>	138
7.2.6.2.1. <i>Métodos no químicos de control</i>	138
7.2.6.2.1. <i>Métodos químicos de control</i>	140

#### **IV. RELACIÓN DE ARTÍCULOS** 143

<b>1. Comparación entre la técnica de centrifugación del microhematocrito (MHCT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar <i>Trypanosoma evansi</i> en cabras inoculadas experimentalmente</b>	145
<b>2. Estudio transversal sobre la prevalencia de la infestación por <i>Trypanosoma evansi</i> en rumiantes domésticos en un área endémica de las Islas Canarias (España)</b>	153
<b>3. <i>Stomoxys calcitrans</i> como vector en la transmisión de la infestación por <i>Trypanosoma evansi</i> entre especies hospedadoras susceptibles en un área endémica de las Islas Canarias (España)</b>	167
<b>4. Papel de los roedores silvestres en la transmisión de la infestación por <i>Trypanosoma evansi</i> en un área endémica de las Islas Canarias (España)</b>	179

<b>V. CONCLUSIONES</b>	193
<b>VI. TRABAJO <i>IN SITU</i> EN ÁREAS AFECTADAS Y PERPSPECTIVAS DE FUTURO</b>	197
<b>1. Situación actual de la población de camellos afectada por surra en Gran Canaria y perspectivas de futuro derivadas de los resultados obtenidos</b>	199
1.1. Introducción	199
1.2. Descripción de la situación y manejo actual en las explotaciones afectadas. Peculiaridades que influyen en el diseño de un plan de control	200
1.3. Acciones llevadas a cabo en las explotaciones afectadas	203
1.4. Planificación de futuro para el control y eventual erradicación de la enfermedad	207
<b>VII. RESUMEN/SUMMARY</b>	211
<b>1. Resumen</b>	213
<b>2. Summary</b>	214
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	215
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	247

## **Tablas.**

<b>1. Parasitemia estimada de acuerdo a la técnica de Woo</b>	98
<b>2. Muestras de equinos evaluados y resultados a lo largo del estudio (2001- 2010), a través de los métodos diagnósticos utilizados</b>	174
<b>3. Especies de roedores capturadas y prevalencia mostrada en las áreas infestadas y en las áreas control de Gran Canaria</b>	187

**Figuras.**

<b>1.</b> Sistemática tradicional del género <i>Trypanosoma</i>	27
<b>2.</b> Sistemática actual del género <i>Trypanosoma</i>	28
<b>3.</b> Sección Salivaria	30
<b>4.</b> Sección Stercoraria	30
<b>5.</b> Morfología de <i>Trypanosoma evansi</i>	35
<b>6.</b> <i>Stomoxys calcitrans</i>	42
<b>7.</b> Dromedario afectado por surra de forma crónica	52
<b>8.</b> Frotis fino con sangre de dromedario parasitado por <i>T. evansi</i> . Frotis fino con sangre de rata parasitada por <i>T. lewisi</i>	95
<b>9.</b> Técnica de Woo	97
<b>10.</b> Electroforesis para producto de PCR	106
<b>11.</b> CATT/ <i>T. evansi</i>	116
<b>12.</b> Cymelarsan®	131
<b>13.</b> Trampa Nzi	138
<b>14.</b> Localización espacial de las granjas de rumiantes muestreadas en la isla de Gran Canaria	158
<b>15.</b> Número de <i>Stomoxys calcitrans</i> y otras moscas no hematófagas recolectadas en el periodo de captura (Julio 2010-Junio 2011)	175
<b>16.</b> Situación geográfica de las Islas Canarias, la isla de Gran Canaria y los puntos de muestreo en los cuales fueron capturados los roedores	183
<b>17.</b> Secuencia de nucleótidos (591 pb) obtenida para el producto de amplificación de la sangre de los roedores usando el cebador TRYP1R	189
<b>18.</b> Secuencia nucleotídica obtenida para el producto de amplificación de la sangre de camellos usando el cebador RoTat 1.2 R	189
<b>19.</b> Trabajo <i>in situ</i> en explotación de camellos	202



# I. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN



*Trypanosoma evansi* es el tripanosoma animal patógeno de más amplia distribución mundial y afecta a especies ganaderas en Asia, África y América Central y del Sur (Luckins y Dwinger, 2004), produciendo una enfermedad denominada surra. Hace más de veinticinco años se describieron en Europa dos casos de infestación por *T. evansi* en una capibara y un perro tras ser importados desde Sudamérica y Nepal respectivamente (Kageruka y Mortelmans, 1971; Hellebrekers y Slappendel, 1982), sin haberse notificado información posterior.

La primera descripción en Europa de tripanosomosis producida por este protozoo en ganado fue realizada por nuestro equipo de investigación en el año 1997 en Gran Canaria, en un dromedario (*Camelus dromedarius*) procedente del noroeste africano, realizándose el diagnóstico tres años después de haber sido importado. Tras el diagnóstico, el animal fue tratado en estado agónico con Naganol –Bayer® Lab.-, produciéndose remisión de la parasitemia a las 24 horas, pero sin observarse recuperación total, produciéndose la muerte un mes después (Gutiérrez *et al.*, 1998).

La primera referencia histórica sobre el dromedario en las Islas, conocido como camello, data del año 1405, procedente del continente africano acompañando las primeras expediciones de los moriscos apresados por Juan de Bethencourt primero y luego por Diego García de Herrera a lo largo del siglo XV en la cercana costa africana, durante la conquista de las Islas por los castellanos (Fabelo, 2008). Desde entonces, las islas han importado animales desde África hasta el momento de la adopción de la nueva normativa en materia de sanidad animal, tras la inclusión de España en la UE. La primera descripción de tripanosomosis en dromedario en el vecino país de Marruecos la realizó Bouin a principios del siglo pasado (citado por Atarhouch *et al.*, 2003).

Tras el diagnóstico del primer caso de *T. evansi* en un dromedario en la isla de Gran Canaria, nuestro equipo realizó estudios de prevalencia en la ganadería camellar de las Islas. La seroprevalencia fue de un 9% mediante IgG-ELISA, oscilando desde un 7,5% en la isla de Tenerife hasta un 10% en la isla de Gran Canaria (Molina *et al.*, 2000). Utilizando CATT/ *T. evansi* (Card Direct Agglutination Test; Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium), la seroprevalencia fue de un 4,8%, oscilando desde 7,1% en la isla de Lanzarote hasta 0% en la isla de Tenerife (Gutiérrez *et al.*, 2000). Estos

valores de seroprevalencia se situaron por debajo de los observados en Marruecos y Mauritania (Dia *et al.*, 1997a, Atarhouch *et al.*, 2003).

Los dromedarios de las Islas Canarias que fueron diagnosticados fueron aislados y tratados con tripanocidas específicos para *T. evansi* (Naganol® y Cymelarsan®), pero se observó la reaparición de *T. evansi* en el año 2002, asociada a un foco de abortos y alta mortalidad neonatal. Hasta ese momento no se habían realizado campañas terapéuticas masivas, pero se establece su recomendación en la población de dromedarios como medida preventiva o terapéutica, de cara a controlar o lograr una eventual erradicación de la enfermedad (Gutiérrez *et al.*, 2005).

A pesar de no existir un censo oficial para *Camelus spp.* en Canarias, se ha estimado en aproximadamente 2000 cabezas (Gutiérrez *et al.*, 2005). Actualmente, Gran Canaria es la única isla afectada por esta enfermedad. No ha sido posible controlarla en un área limitada con aproximadamente 200 dromedarios, a pesar de haberse ejercido medidas sanitarias similares a otras zonas del Archipiélago, donde actualmente se consideran libres de la enfermedad. Se han propuesto al respecto dos hipótesis que expliquen estas observaciones: por un lado la pérdida de eficacia del tratamiento con Cymelarsan® y subsecuente reaparición de la enfermedad, o la presencia de reservorios de la enfermedad en las áreas afectadas y subsecuente reinfestación (Gutiérrez *et al.*, 2010). El foco principal de atención de esta tesis doctoral se centra en evaluar esta última posibilidad y complementar el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en Canarias. Por tanto, de forma complementaria al tratamiento masivo en la zona afectada, se establece la necesidad de identificar posibles reservorios de la enfermedad mediante el chequeo en otras especies animales (Gutiérrez *et al.*, 2005).

En primer lugar, el número de animales rumiantes en Canarias, y fundamentalmente de caprino y ovino, es considerablemente mayor que el de camélidos. El caprino es la especie ganadera económicamente más importante de las islas en producción lechera, y la segunda más importante en producción cárnica, detrás del sector avícola. Destaca el mayor peso del censo de pequeños rumiantes en las islas orientales, con más de dos terceras partes del número total de ambas especies concentrados en la provincia de Las Palmas (Estadística Agraria de Canarias, 2009), dentro de la cual se encuentra la isla de Gran Canaria. Aunque la explotación de estas especies tiende cada vez más hacia un

modelo productivo intensivo, aún existe pastoreo en algunas zonas. Así, de forma tradicional los pequeños rumiantes en Canarias se han desarrollado próximos a los hábitats de los dromedarios, así como también ocurre en algunos otros lugares del mundo, donde podrían ser reservorios potenciales del protozoo (Gutiérrez *et al.*, 2010). En el este de África se ha descrito la posibilidad de que cabras y ovejas puedan ser hospedadores de *T. evansi*, cuando son criados en rebaños con dromedarios, y se ha demostrado tras la inoculación experimental que las cabras pueden padecer un cuadro severo (Ngeranwa *et al.*, 1993). Nuestro grupo de investigación ha demostrado la susceptibilidad del caprino a la cepa canaria de *T. evansi*, cursando la enfermedad generalmente de forma subclínica con baja parasitemia (Gutiérrez *et al.*, 2004).

En contraste, en Mauritania y tras estudios de campo se considera limitado el papel que pueden desempeñar los pequeños rumiantes en la epidemiología de la tripanosomosis por *T. evansi* en camellos, a pesar de haberse demostrado susceptibilidad de forma experimental a la cepa local, produciendo una clínica de abortos y pérdida de peso en ovino, y un curso generalmente subclínico en caprino (Jacquie *et al.*, 1993).

Con estos antecedentes nuestro grupo se propuso realizar varios estudios como parte de esta tesis. Por un lado uno basado en la valoración de dos técnicas diagnósticas directas sobre un modelo experimental caprino inoculando la cepa canaria de *T. evansi*. Por otro lado, y tomando como base el anterior estudio, se realizó un trabajo de campo sobre las especies ganaderas rumiantes en la isla de Gran Canaria para conocer si pueden actuar como reservorios de la enfermedad y, en segundo lugar, si desempeñan algún papel en la epidemiología de la enfermedad objeto de estudio.

En segundo lugar, y dado que conforme al grupo *ad hoc* de la OIE sobre tripanosomas no transmitidos por tse-tsé (NTTAT), dentro del grupo de especies altamente susceptibles a la surra además de los camellos, están incluidos perros y equinos (OIE, 2009), valoramos incluir en nuestro estudio a equinos residentes en la zona afectada de Gran Canaria.

Con respecto a los perros y de acuerdo a Hoare (1972), éstos están protegidos por el pelaje de los ataques de los vectores de *T. evansi* y se produce la contaminación por vía oral tras la ingesta de cadáveres de ungulados afectados por surra. A pesar de que

Desquesnes (2004) describe este tipo de contaminación como el principal modo de infestación en carnívoros en América, esta posibilidad es remota en Canarias y por tanto no la hemos incluido como objeto de estudio en la presente Tesis; en primer lugar, debido a la imposibilidad de acceso de carnívoros a cadáveres de los camellos infestados y, por otra parte, por la creciente implicación de los propietarios en el cuidado de los perros como mascotas, lo cual lleva implícito una atención veterinaria cada vez mayor. A esto hay que añadir que Canarias es una región endémica de *Dirofilaria immitis*, una infestación también principalmente de carácter hemático que afecta sobre todo a perros y en la que es habitual el diagnóstico a través de la técnica de gota gruesa, técnica sencilla y económica. Esta técnica diagnóstica es útil también para el diagnóstico de *T. evansi*, figurando en el capítulo 2.1.17 del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2010 (OIE, 2011). Hasta el momento ningún clínico veterinario ha notificado infestación por *Trypanosoma* spp. en carnívoros en Canarias. Con estos antecedentes nuestro grupo de investigación no ha considerado prioritario incluir en esta tesis a los carnívoros, aunque en función de las conclusiones que se puedan extraer de la misma, podría ampliarse el trabajo sobre estas especies en el futuro.

En el caso de los equinos no es habitual realizar controles rutinarios de sangre en busca de hemoparásitos, al menos en zonas fuera de los trópicos, exceptuando situaciones en las que se evidencien signos clínicos sospechosos que sugieran este tipo de patologías. En el caso de Gran Canaria, además, estos animales tienen libre movimiento por toda la isla, siendo habituales las excursiones a caballo tanto como actividad turística como privada, lo que podría comportar situaciones de riesgo epidemiológico. Por esta razón, dentro de esta tesis doctoral se ha marcado como otro objetivo la vigilancia de *T. evansi* en équidos, con remisión de muestras de sangre por parte de veterinarios clínicos ambulantes así como visitas a cuadras por parte de nuestro equipo.

Además y ya habiendo comentado las posibilidades de transmisión en carnívoros a través de la vía oral, así como se comentará a continuación en roedores, y teniendo en cuenta los modos de transmisión descritos para *T. evansi*, consideramos que la forma más probable de contagio de la surra en Canarias sería a través de insectos vectores. Dípteros pertenecientes a los géneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Atylotus* y *Lyperosia*

(sinónimo de *Haematobia*) transmiten la surra de forma mecánica a través de la picadura (Brun *et al.*, 1998), siendo hasta el momento desconocidas las especies responsables de la transmisión en esta región.

Otros modos de transmisión como los representados por picaduras de vampiros se circunscriben a Sudamérica (Desquesnes, 2004), existiendo únicamente en Canarias nueve especies de quirópteros silvestres (Martín González y García, 2004) con hábitos insectívoros y frugívoros pero no hematófagos, por lo que se ha descartado esta posibilidad. Se ha prestado especial atención a la posibilidad de transmisión iatrogénica en la población de camellos afectados a través de agujas compartidas y prácticas colectivas como vacunación e identificación, por lo cual se ha informado al respecto y se ha recomendado la profilaxis en este sentido para evitar este tipo de contagio.

Con estos antecedentes, y de acuerdo también a la aparición de enfermedades emergentes y adaptación de vectores a nuevos hábitats, en gran parte como consecuencia del cambio climático y corrientes migratorias, de cara a la sanidad animal y salud pública la vigilancia epidemiológica en áreas subtropicales como Canarias se muestra esencial. Por esta razón se ha enmarcado dentro de esta tesis un trabajo para documentar la presencia de insectos vectores que pudieran estar implicados en la transmisión de la surra en Canarias, y se intenta correlacionar esta información con la vigilancia en équidos, lo que servirá como complemento a los trabajos anteriores y a la descripción de la epidemiología de la enfermedad en las islas.

Por último y en tercer lugar, debido a la susceptibilidad de los roedores a *T. evansi*, dentro de esta tesis se ha enmarcado un estudio sobre el papel que desempeñan estos micromamíferos silvestres en la epidemiología de esta enfermedad. Como ejemplos, las capibaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), que son los roedores de mayor tamaño del mundo y habitan de forma salvaje en Sudamérica, actúan como reservorios de *T. evansi*, sin mostrar signos clínicos manifiestos (Franke *et al.*, 1994); por otro lado, se ha citado la posibilidad de infestación por *T. evansi* en pequeños roedores por vía oral (Raina *et al.*, 1985; da Silva *et al.*, 2007). Por estas razones y dado que las ratas y ratones son animales considerados como plagas, siendo habitual su presencia en explotaciones ganaderas y siendo difícil su control, la posibilidad de contacto directo de esta fauna

silvestre con la doméstica es elevada, lo cual podría suponer un riesgo epidemiológico potencial, hasta el momento no evaluado para esta enfermedad en Canarias.

El estudio de la surra en Canarias toma además importancia por los siguientes motivos:

- En Canarias, el dromedario ha sido la única especie en la que se ha descrito la enfermedad hasta el momento, y es además en esta región donde se mantiene la única ganadería camellar tradicional de Europa, con más de seis siglos de existencia. La importancia de este animal ha sido tal, que recientemente la Comisión Nacional de Coordinación para la Conservación, Mejora y Fomento de Razas Ganaderas acordó el reconocimiento de la raza Camello Canario y su inclusión en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (Notas de prensa de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. 31/3/2011). Actualmente la cría de esta especie en las islas tiene como fin la explotación dentro del sector turístico, que es el principal motor de la economía canaria.
- Por otro lado y también a nivel local, es patente la importancia de los pequeños rumiantes en Canarias. Por esta razón, el estudio de esta enfermedad en estas especies, se muestra también esencial, de cara a la repercusión que podría tener la aparición de nuevas enfermedades en el ganado sobre las economías familiares dependientes del sector primario. El ganado vacuno no presenta un censo elevado en Canarias; sin embargo, dado que figura como especie altamente susceptible para la OIE (2011), ha sido también evaluado en la presente tesis.
- A nivel estatal e internacional, recientemente han aparecido focos puntuales de surra en Europa continental, en zonas donde los camellos son considerados exóticos. Estos focos han estado asociados a la importación de dromedarios desde Canarias. Afortunadamente, fueron controlados y la enfermedad no alcanzó la categoría de endémica (Desquesnes *et al.*, 2008; Tamarit *et al.*, 2010). Desde una óptica de garantías en la seguridad sanitaria del comercio de animales y sus productos, tanto entre autonomías como a nivel internacional, se muestra esencial el estudio de esta enfermedad en Canarias.

- Desde la perspectiva en salud pública, el tema toma importancia a raíz de las posibilidades de zoonosis por *T. evansi*. A este respecto, y aunque se presenta de forma infrecuente, se han realizado recientes descripciones de infestaciones y exposición al protozoo en la especie humana (Joshi *et al.*, 2005, Shegokar *et al.*, 2006; Vanhollebeke *et al.*, 2006). La observación de distintos grados de resistencia natural al suero humano en algunos stocks de *T. evansi*, hace necesaria una mayor atención a su probable potencial zoonótico (Lai *et al.*, 2010).



## II. OBJETIVOS



1. Comparar las técnicas diagnósticas de concentración del hematocrito (MHCT) y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *T. evansi* en cabras inoculadas experimentalmente, de cara a su utilidad en el posterior estudio de campo sobre rumiantes.
2. Determinar el papel de los rumiantes domésticos en la epidemiología de *T. evansi* en la isla de Gran Canaria.
3. Determinar el papel de los équidos residentes o próximos a la zona afectada en la epidemiología de la enfermedad en Gran Canaria.
4. Determinar los vectores responsables de la transmisión de la enfermedad en Canarias.
5. Determinar el papel de los roedores silvestres en la epidemiología de *T. evansi* en la isla de Gran Canaria.



### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## 1. Historia y evolución de *Trypanosoma evansi*

### 1.1. Historia del término *Trypanosoma evansi*: sinonimias

Los tripanosomas son protozoos pertenecientes al género *Trypanosoma*. Los primeros organismos pertenecientes a este género fueron descubiertos en Berna en el año 1841, en sangre de trucha (*Salmo fario*) por Valentine. El término *Trypanosoma* fue acuñado en 1843 por Gruby, un médico húngaro que trabajó en París. Este científico empleó dicho término, derivado fonéticamente de la combinación de dos palabras griegas (*τρύπανο*: taladro o barrena y *σώμα*: cuerpo), para denominar a organismos con un movimiento parecido al de las anguilas que encontró en sangre de ranas, y a los que llamó *Trypanosoma rotatorium* (Tobey, 1906; Itard, 1989).

*Trypanosoma evansi* fue el primer tripanosoma descrito e identificado como agente causal de tripanosomosis en mamíferos (Mahmoud y Gray, 1980). Este microorganismo, agente causal de la surra, fue denominado como *T. evansi* en honor al veterinario militar Griffith Evans, que descubrió este flagelado tras sus trabajos en camellos y équidos infestados en el distrito Dara Ismail Khan, Punjab en la India, en 1880 (Evans, citado por Indrakamhang, 1998; Cordero del Campillo, 2001).

Cinco años más tarde, Steel encontró los mismos organismos parasitando mulas procedentes de la Unión de Myanmar (antiguamente denominada Birmania), siendo referidos estos protozoos por Balbiani, como “tripanosomas”, en el año 1888 (Stephen, 1986).

La enfermedad debida a *T. evansi* (= *T. ninaekohlyakimovi*, Hoare, 1972) fue más tarde también descrita por Yakimoff (1921, 1923) en camellos rusos en Turkestan. Yakimoff (1923) estableció que la tripanosomosis en camellos rusos fue detectada primero por Feinschmidt en 1912, en Astrakhan y Saratov (Yakimoff, citado por Mahmoud y Gray, 1980).

A lo largo de los años, se han observado enfermedades similares causadas por tripanosomas indistinguibles de *T. evansi*, en otras partes del mundo y en diversos

mamíferos como hospedadores (Hoare, 1972). Desde su primera descripción han sido utilizados varios sinónimos: *T. equinum* (Voges, 1901), *T. evansi* var. *mborii* (Laveran, 1903), *T. soudanense* (Laveran, 1907), *T. soudanense* var. *berberum* (Sergent *et al.*, 1912), *T. marocanum* (Sergent *et al.*, 1915), *T. aegyptum* (Nattan-Larrier y Noyer, 1932) (autores citados por Stevens y Brisse, 2004). Se han utilizado treinta y tres nombres diferentes, pero actualmente se acepta que el único nombre válido para el parásito causante de la surra es el de *T. evansi* (Hoare, 1972).

El Comité Internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) había recomendado el nombre de *T. brucei evansi* en el año 1978, basándose en que *T. evansi* derivó de *T. brucei*, y en que esta evolución se produjo por pérdida del ADN kinetoplástico (ADNk). Sin embargo, basándose en la Nomenclatura Zoológica Internacional, los participantes de la “10ª Reunión Internacional sobre *Trypanosoma evansi*” señalaron que la denominación *T. brucei evansi* no era adecuada, porque para este organismo el término “*evansi*” fue acuñado antes de la denominación “*brucei*”. Por dicha razón el grupo *ad hoc* sobre tripanosomosis animales no transmitidas por tse-tse (NTTAT) de la Organización Internacional de Epizootias (OIE), mientras tanto, prefiere referirse a la nomenclatura que fue presentada a la Comisión Internacional de Nomenclatura Zoológica en 1989, y a partir de entonces re-denominada y confirmada en las 10ª y 11ª reuniones internacionales sobre *Trypanosma evansi*: *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* (Desquesnes, 2004).

Lai *et al.*, (2008) niegan el estatus de especie tanto para *T. evansi* como para *T. equiperdum*, considerándolas como subespecies de *T. brucei*, y sugiriendo por tanto los nombres de *T. brucei evansi* y *T. brucei equiperdum* respectivamente.

## 1.2. Historia del término “surra”: sinonimias

El término “surra”, denominación aceptada internacionalmente, hace alusión a una observación clínica de la enfermedad, procede del hindú y significa “corrupto” (Cordero del Campillo y Martínez Fernández, 1999), pero existen otras denominaciones en otros lugares del mundo. Así en Sudamérica y Centroamérica esta enfermedad recibe los nombres de “Murrina”, “Derrengadera”, “Mal de Caderas” y “Tristeza”. En el norte de

África se le conoce como “El Debab”, una palabra árabe que significa enfermedad de la mosca; “Guifar” o “Dioufar” en Chad; “Tahaga” en Mali; “Doukane” en Etiopía; “Tabourit” en Mauritania (Itard, 1989; Dia *et al.*, 1997a, b, c). En Rusia es conocida con el término de “Su-auru” (Hoare, 1972).

### 1.3. Evolución de *Trypanosoma evansi*

De todas las especies de tripanosoma, *T. evansi* tiene la distribución mundial más amplia y comparte el rango de hospedadores mamíferos con *T. brucei*. Así, el origen de *T. evansi* y *T. equiperdum* ha sido objeto de debate y de acuerdo a Hoare (1972): “...si animales infestados con *T. b. brucei* hubieran sido introducidos desde un área enzoótica de Nagana hacia una nueva localización libre de moscas tse-tse, donde el tripanosoma fue transmitido subsecuentemente por vectores mecánicos, especialmente tábanos...la pérdida de contacto con *Glossina* podría haber llevado a la transformación de *T. b. brucei* hacia una estirpe monomórfica indistinguible de las especies ahora conocidas como *T. evansi*...”

De este modo, la transmisión de *T. brucei* por moscas tse-tse (*Glossina spp.*) ocurre exclusivamente en África en un área de aproximadamente 10 millones de km<sup>2</sup>, extendiéndose a ambos lados del ecuador, desde la latitud 15° N a 20° S. *T. evansi* es probablemente un *T. brucei* que perdió la capacidad para la transmisión cíclica al ser introducido por animales domésticos, principalmente camellos, en áreas libres de moscas tse-tse (Itard, 1989).

A la hipótesis de Hoare (1972) referente a la aparición de *T. evansi* por evolución a partir de *T. brucei*, Lun y Dresser (1995) aportaron que se pudo haber debido a la pérdida del maxicírculo del ADNk durante la replicación de un mutante de *T. brucei*, lo cual estaría correlacionado con la amplia distribución y rango de hospedadores de *T. evansi*. Como resultado de ello y de la ausencia de cambios morfológicos de *T. evansi* en el vector, la transmisión mecánica no depende de un vector estricto.

Aquellos tripanosomas de la sección Salivaria que exhiben alteraciones naturales del ADNk (incluye a *T. equiperdum* y *T. evansi*), han perdido la capacidad de diferenciarse

dentro del insecto vector y son transmitidos por picaduras de moscas o por vía venérea (Brun *et al.*, 1998). Sin embargo, en contraposición a la idea del origen de *T. evansi* a partir de *T. brucei*, Brun *et al.* (1998) plantearon la hipótesis de que *T. evansi* pudiera haber surgido desde una forma sanguínea del *T. equiperdum*. A su vez, Lun *et al.* (2004) sugirieron que *T. equiperdum* evolucionó a partir de una cepa ancestral de *T. brucei* adaptada a équidos, que durante esta fase de adaptación perdió parte del maxicírculo de su ADNk.

Filogenéticamente, *T. evansi* está muy próximo a *T. brucei*, y presenta una gran homogeneidad genética. Esta homogeneidad se observa en todo el subgénero *Trypanozoon*, en el que se incluyen las especies *T. brucei* y *T. evansi*, observándose particularmente homogeneidad genética entre las cepas de *T. evansi* (Ventura *et al.*, 2002; De Oliveira *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008).

Lai *et al.* (2008) se oponen a la hipótesis de la aparición puntual y única de *T. evansi* a partir de *T. brucei*, y sugieren que la aparición de mutantes akinetoplástidos y diskinetoplástidos ocurre espontáneamente y frecuentemente en *T. brucei*.

#### **1.4. Distribución geográfica de *Trypanosoma evansi***

Originalmente, la distribución de *T. evansi* coincidía con la del camello (Soulsby, 1987). Actualmente *T. evansi* es el tripanosoma animal patógeno de mayor distribución mundial y afecta al ganado en Asia, África y América Central y del Sur (Luckins y Dwinger, 2004). En Latinoamérica existen cuatro especies de tripanosomas con interés médico-veterinario e importancia económica: *T. cruzi*, *T. equiperdum*, *T. evansi* y *T. vivax*. Solamente *T. cruzi*, perteneciente a la sección Stercoraria, es una especie indígena de América y responsable de la Enfermedad de Chagas, siendo las otras tres especies, pertenecientes a la sección Salivaria, importadas por el hombre junto con sus principales hospedadores domésticos. La introducción de *T. evansi* en territorio americano, tuvo lugar en el siglo XVI en Colombia por caballos árabes que pertenecían a las caballerías de los conquistadores españoles (Desquesnes, 2004).

En Europa continental se describieron dos casos de infestación por *T. evansi* tras la importación de una capibara de Sudamérica y un perro procedente de Nepal (Kageruka and Mortelmans, 1971; Hellebrekers and Slappendel, 1982). La primera descripción en ganado de la enfermedad por *T. evansi* en Europa tuvo lugar en 1997 en territorio español, concretamente en un dromedario de las Islas Canarias. En esa época la población de camélidos en las islas rondaba los 1400 ejemplares, siendo en su mayoría importados de países próximos del noroeste africano, como Marruecos y Mauritania. La enfermedad fue diagnosticada en un dromedario que residía en una explotación ganadero-turística del sur de Gran Canaria. Su propietario, al observar emaciación, alopecia y atrofia muscular y de la joroba en el animal posteriormente diagnosticado, solicitó atención por veterinarios. El dromedario, un macho entero de 9 años de edad había sido importado hacía 3 años del noroeste africano. El animal pudo haber sido contagiado en origen, ya que los animales con formas crónicas de la enfermedad pueden sobrevivir 3 o 4 años. Tras el diagnóstico, el animal fue tratado en estado agónico con Naganol –Bayer® Lab.-, produciéndose remisión de la parasitemia a las 24 horas, pero sin observarse recuperación total y con muerte al mes de tratamiento (Gutiérrez *et al.*, 1998).

Tras esta primera descripción en Canarias se realizaron estudios en la ganadería camellar de las islas, y la seroprevalencia observada fue de un 9% mediante IgG-ELISA (Molina *et al.*, 2000), y de un 4,8% utilizando CATT/ *T. evansi* (Gutiérrez *et al.*, 2000). Sin embargo, la seroprevalencia observada en Canarias es más baja que las observadas en dromedarios de los países vecinos de Marruecos y Mauritania. Así, la prevalencia de la enfermedad en Marruecos mostró un valor de 14,1% utilizando CATT/*T. evansi*, y 18,2 % a través de IgG-ELISA. (Atarhouch *et al.*, 2003). En Mauritania la seroprevalencia fue de 16,5%, 24,3% y 14,1 % a través de CATT/ *T. evansi*, IFI y Ag-ELISA respectivamente. (Dia *et al.*, 1997a).

En territorio continental europeo se detectó un foco de surra en el año 2006, en dromedarios del departamento de Aveyron (Francia). El foco apareció en una granja tras la importación de cinco dromedarios desde las Islas Canarias durante el mismo año. La granja ya poseía ocho dromedarios importados de Canarias en el año 1995, de los cuales tres resultaron positivos, junto a dos de los que habían sido importados recientemente. No se observó *T. evansi* en ningún otro animal de la granja, ni de granjas vecinas, pero

algunas de las ovejas de estas granjas mostraron positividad a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y serología (Desquesnes *et al.*, 2008). Posteriormente, en el verano de 2008 se detectó otro foco de surra en Alicante (España), en una granja que había importado dromedarios desde las Islas Canarias hacía un año y medio. Este brote afectó a dromedarios, caballos y burros (Tamarit *et al.*, 2010).

### **1.5. Reseñas históricas de los camellos (*Camelus dromedarius*) en Canarias**

La primera referencia histórica del camello (*Camelus dromedarius*) en las islas data del año 1405 procedente del continente africano, acompañando las primeras expediciones de los moriscos apresados por Juan de Bethencourt primero y luego por Diego García de Herrera, a lo largo del siglo XV en la cercana costa africana, durante la conquista de las islas por los castellanos (Fabelo, 2008).

Así en la obra francesa “Le Canarien”, donde se refleja la crónica de la conquista de Canarias relatada por dos de sus protagonistas, Gadifir de La Salle y Jean de Béthencourt, y al margen de interpretaciones históricas, aparecen de forma clara en alguno de sus capítulos las primeras referencias. Así, en cuanto al camello se cita textualmente:

*“...muy cerca del puerto de Bojador; y allí bajó Monseñor de Béthencourt con sus hombres y entraron por lo menos ocho leguas en el país y prendieron hombres y mujeres que llevaron consigo, y más de tres mil camellos, [ ] y después volvieron a Gran Canaria, como Monseñor de Béthencourt lo había ordenado, pero el temporal los cogió en el camino, de manera que de las tres barcazas una llegó a Erbania (refiriéndose a Fuerteventura) y la segunda a la isla de La Palma y allí se quedaron, hasta que llegó la tercera barcaza, en que venia Monseñor de Béthencourt, haciendo la guerra a los del país”*

En “Historia de las siete islas de Canaria” (Arias de Marín de Cubas, 1986) se cita:

*“Salieron de Ervania o Fuerteventura dia 6 de Octubre del mismo año de 405, guiando las tres Galeras al Puerto grande frontero de Telde y Argones que es Gando, y*

*dandoles un recio norte desgarran a tierra de Africa junto a el cabo Boxador, entraronla por mas de diez leguas onde estubieron ocho dias, apresaron muchos arabes con familias y mas de quatro mil camellos;...”*

Las Islas Canarias constituyen una región ultraperiférica que pertenece políticamente a la Unión Europea y presenta unas características climáticas muy diferentes a las de la Europa continental, debido a su proximidad a la costa africana, distando 95 km del Sáhara Occidental. Las condiciones climáticas constantes, con temperaturas suaves durante todo el año, han convertido a las islas en un atractivo turístico a nivel mundial, permitiendo a este sector situarse como eje económico principal del archipiélago a partir de los años sesenta del pasado siglo. El desarrollo del turismo tuvo una influencia clara sobre el dromedario, conocido en las islas como camello, provocando un cambio radical en el modo de su explotación. Antaño fue una especie ganadera explotada en labores agrícolas y construcciones para aumentar la superficie cultivable, modelando incluso el paisaje, como el caso de La Geria en la de isla de Lanzarote, ahora conocida mundialmente, para después en esos mismos paisajes llevar a cabo con la llegada de turistas, labores de transporte recreativo, lo que supuso un nuevo enfoque a la rentabilidad de este animal como especie ganadera.

Este nuevo modelo de explotación del dromedario se exportó a las vecinas islas de Fuerteventura, Gran Canaria y Tenerife, que junto a Lanzarote son las cuatro islas donde habitan dromedarios (Gutiérrez *et al.*, 2000).

Después de la entrada de España en la Unión Europea, y tras asumir una nueva legislación comunitaria en materia de sanidad animal, las importaciones de camellos africanos a las Islas Canarias fueron reduciéndose poco a poco hasta desaparecer por completo. No obstante, entre los animales que se encuentran en la actualidad en las distintas explotaciones, aún es fácil distinguir algunos ejemplares con marcas de fuego en el cuello que revelan el origen de los mismos y la tribu a la que pertenecían (Fabelo, 2008).

En un análisis genético utilizando 13 microsatélites en la población canaria de dromedarios, se observó la mayor proximidad genética con dromedarios del Norte de África (Tinduf, Argelia) y un cierto grado de subdivisión, con importantes diferencias

genéticas entre los criadores. Esto, unido al escaso censo de este animal justificaría la puesta en funcionamiento de un programa de conservación genética que permitiera el manejo eficiente de la diversidad genética actual en la única población tradicional de esta especie en Europa (Schulz *et al.*, 2010).

A este respecto, la Comisión Nacional de Coordinación para la Conservación, Mejora y Fomento de Razas Ganaderas, acordó en reunión celebrada el 24 de marzo de 2011 en Madrid, el reconocimiento de la raza Camello Canario y su inclusión en el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (Notas de prensa de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Medio Ambiente del Gobierno de Canarias. 31/3/2011).

#### **1.6. Situación actual de la surra desde la óptica del comercio internacional de animales**

En la antigua clasificación de las enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Internacional de Epizootias (OIE) mantenida hasta 2005, la surra tenía el estatus de enfermedad dentro de la lista B de équidos. Actualmente se encuentra como enfermedad de varias especies en la lista de la OIE, incluida en el capítulo 2.1.17 del Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2010. En el mismo manual se cita como expertos y laboratorios de referencia para la enfermedad al Dr. Filip Claes del Institute of Tropical Medicine Antwerp en Bélgica, y al Prof. Noboru Inoue del National Research Center for Protozoan Diseases, en Japón. No obstante, hasta el momento en dicho manual no figura todavía asignado ningún test diagnóstico para *T. evansi* ni con categoría de “prescrito” ni “alternativo” para el movimiento internacional de animales y productos de origen animal (OIE, 2011).

Así, de acuerdo a Desquesnes *et al.* (2008), la enfermedad producida por *T. evansi* está listada para las organizaciones internacionales sólo como surra en caballos, pero no en camellos. En el Código Sanitario para los Animales Terrestres 2010, cuyo objetivo es garantizar la seguridad sanitaria del comercio internacional de animales terrestres y productos de animales terrestres, aparece la durina como enfermedad listada propia de los équidos, cuyo agente causal es *T. equiperdum*. Sin embargo, en dicho código no figura la enfermedad producida por *T. evansi* en las enfermedades comunes a varias

especies, ni siquiera en las recomendaciones aplicables a las enfermedades de équidos (OIE, 2011).

### **1.7. Situación actual de *Trypanosoma evansi* desde la óptica de la salud pública: potencial zoonótico**

La tripanosomosis por *T. evansi* se ha convertido en una enfermedad emergente potencial tras su reciente descripción en la especie humana. La enfermedad fue observada en 2004 en un granjero hindú de 40 años del distrito de Chandrapur en el estado de Maharashtra. El paciente presentó una clínica de fiebre intermitente asociada a escalofríos y sudoración y que evolucionó hacia déficit sensorial, desorientación, agitación y comportamiento violento (Joshi *et al.*, 2005). De acuerdo a Vanhollebeke *et al.* (2006), la susceptibilidad de este paciente a esta protozoosis se atribuyó a una deficiencia de apolipoproteína L-1 (Apo-L1), una molécula que se encuentra de forma normal en el suero humano y que representa un factor tripanolítico natural.

Tras esta primera descripción de *T. evansi* en la especie humana, se realizó un estudio de seroprevalencia en el mismo pueblo en el que se localizó el paciente afectado. Se observaron resultados positivos al CATT/ *T. evansi*, a alta dilución del suero, en un 3,32% de los habitantes, sin confirmarse parasitemia en ningún caso, lo que indica una frecuente exposición de la población humana a *T. evansi* en esta área (Shegokar *et al.*, 2006).

En algunas subespecies de *T. brucei* se ha citado la presencia del gen de resistencia asociada al suero (SRA), que confiere resistencia al suero del hospedador, lo que ha proporcionado información importante en la gama de huéspedes que pueden afectarse por este tripanosoma y los mecanismos de resistencia que se presentan (Pays *et al.*, 2006). A este respecto, un fragmento homólogo a SRA llamado SRAbc se encuentra en todos los stocks de *T. brucei evansi* (Lai *et al.*, 2009).

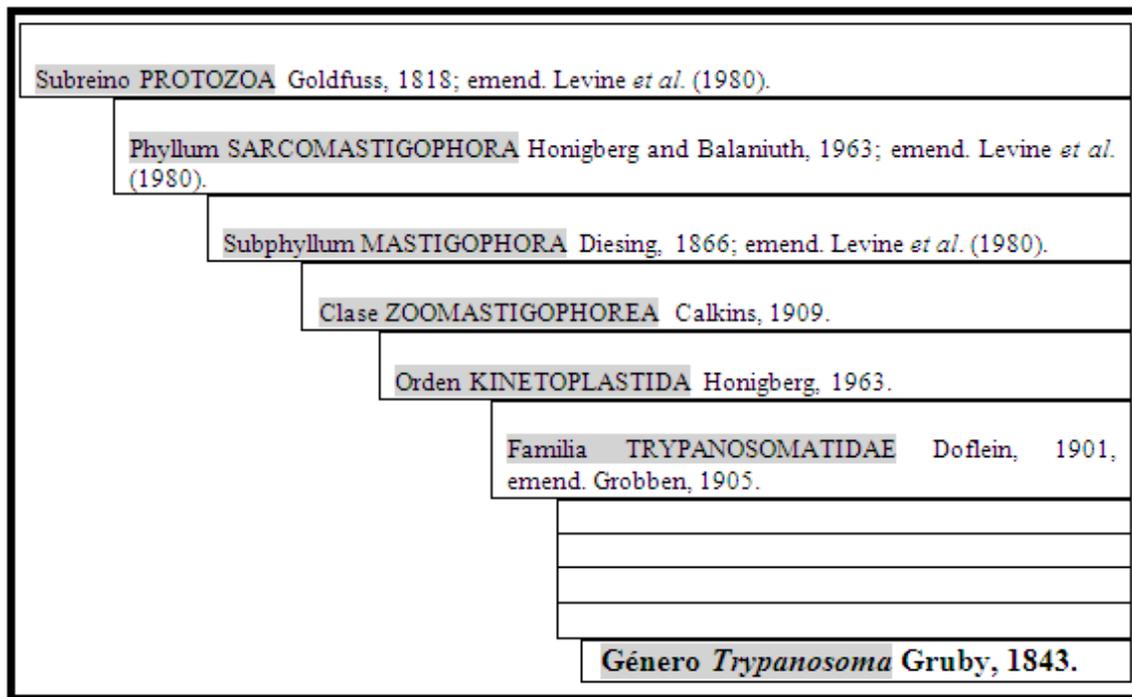
En estudios realizados en algunos stocks de *T. evansi*, obtenidos de distintos hospedadores animales y variada procedencia geográfica, se ha observado distinto nivel de sensibilidad a los efectos del suero humano. Ciertos stocks muestran una resistencia

natural al mismo, aunque hasta el momento se desconocen las causas de esta resistencia. También se desconoce la función del fragmento SRAbc y si a su vez podría representar un componente evolutivo potencial que pueda dar lugar al gen SRA, que conferiría al parásito resistencia al suero humano. La existencia de distintos grados de resistencia natural al suero humano, hace necesaria una mayor atención a la posibilidad potencial de infestación en humanos por este tripanosoma animal (Lai *et al.* 2010).

## 2. TAXONOMIA DE *Trypanosoma evansi*

### 2.1. Sistemática tradicional de *Trypanosoma spp.*

La posición sistemática tradicional de *Trypanosoma spp.* dentro de los protozoos y la clasificación revisada de los tripanosomas de mamíferos, acorde a Levine *et al.* (1980) es la siguiente:



**Figura 1.** Sistemática tradicional del género *Trypanosoma*. Adaptado de Levine *et al.* (1980).

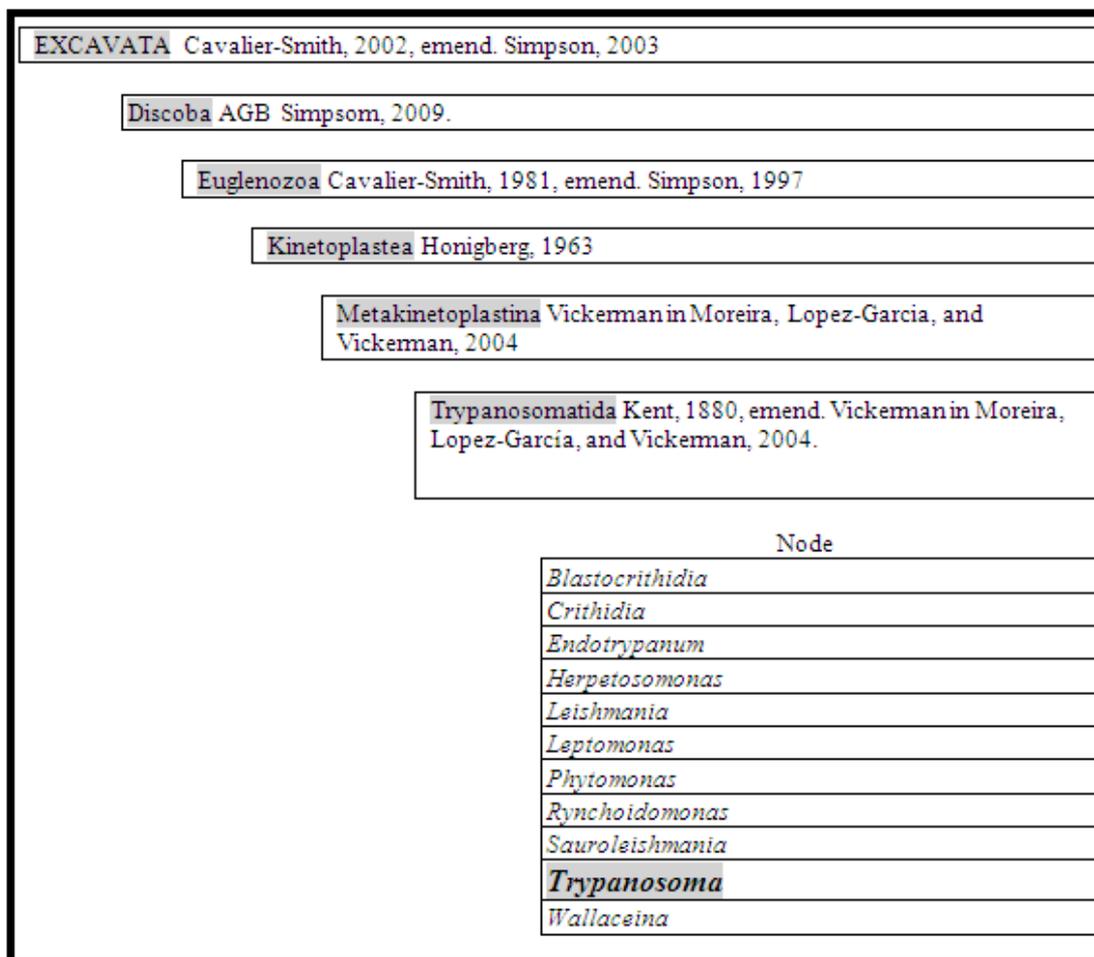
### 2.2. Sistemática actual de *Trypanosoma spp.*

La revisión de Levine *et al.* (1980) para los protozoos, basada en estudios ultraestructurales, ha sido recientemente actualizada por Adl *et al.* (2005), con la combinación de estudios morfológicos y moleculares, incluyendo a la mayoría de los eucariotas en seis "super-grupos" que representan el agrupamiento básico similar a los tradicionales reinos.

La nueva clasificación de los eucariotas fue propuesta por la Sociedad Internacional de Protistología, y recomendada como base para futuras revisiones, donde *Trypanosoma* spp. queda incluido dentro del supergrupo Excavata (Adl *et al.* 2005).

El supergrupo Excavata está constituido por eucariotas unicelulares, la mayoría de los cuales son flagelados heterótrofos. Dentro del mismo, aparte de *Trypanosoma* spp., se incluyen otros grupos responsables de enfermedades importantes, tal como *Giardia* spp. y *Trichomonas* spp. (Simpson y Roger, 2004).

Así, la clasificación actual de *Trypanosoma* spp., acorde a Adl *et al.* (2005) y modificada por Hampl *et al.* (2009) es la siguiente:



**Figura 2.** Sistemática actual del género *Trypanosoma*. Adaptado de Adl *et al.* (2005) y Hampl *et al.* (2009).

Este nuevo enfoque en la filogenia de los eucariotas ofrece una nueva visión de la evolución de los mismos. Así, se enfatiza que los tripanosomas lejos de ser organismos primitivos o fósiles vivientes, que ofrecen una perspectiva en la biología celular de las antiguas células eucariotas y extintas *per se*, se constituyen al contrario como organismos muy evolucionados y especializados para sus entornos específicos. Para ello se asienta como base la genómica comparativa de una manera rigurosa, en la cual se tiene en cuenta tanto la ausencia como la presencia de genes dentro de un genoma (Dacks *et al.* 2008).

### **2.3. Clasificación de los tripanosomas de importancia veterinaria y médica que afectan a mamíferos**

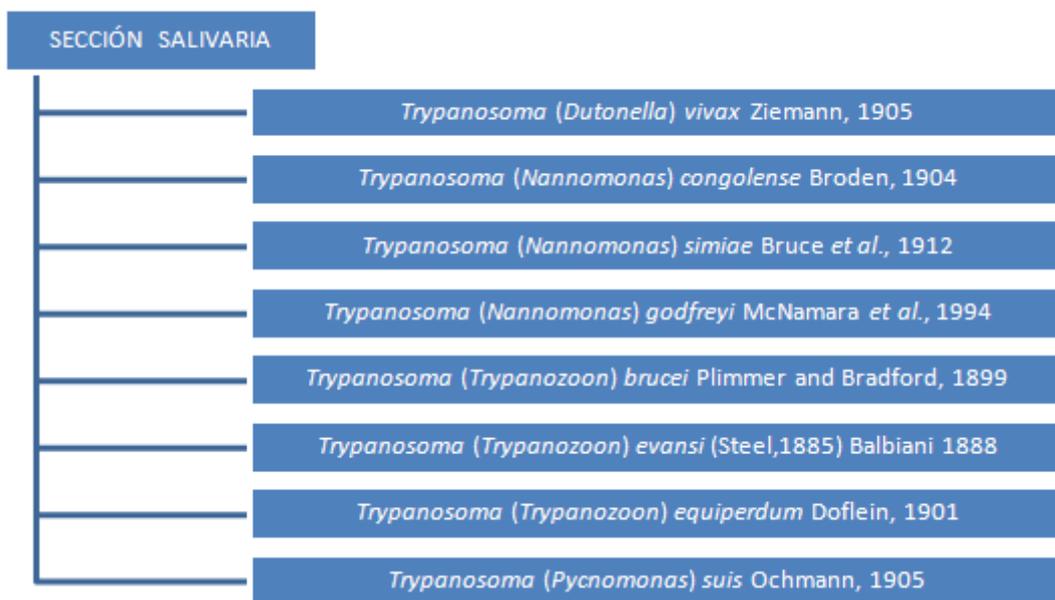
Los tripanosomas que afectan a mamíferos están incluidos en dos grupos distintos y, en consecuencia, han sido divididos en dos secciones (Hoare, 1972):

(A) sección Stercoraria (subgénero *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* y *Herpetosoma*), en la cual los tripanosomas son producidos en el intestino posterior del insecto vector desde donde son transmitidos de forma contaminativa al hospedador definitivo; y

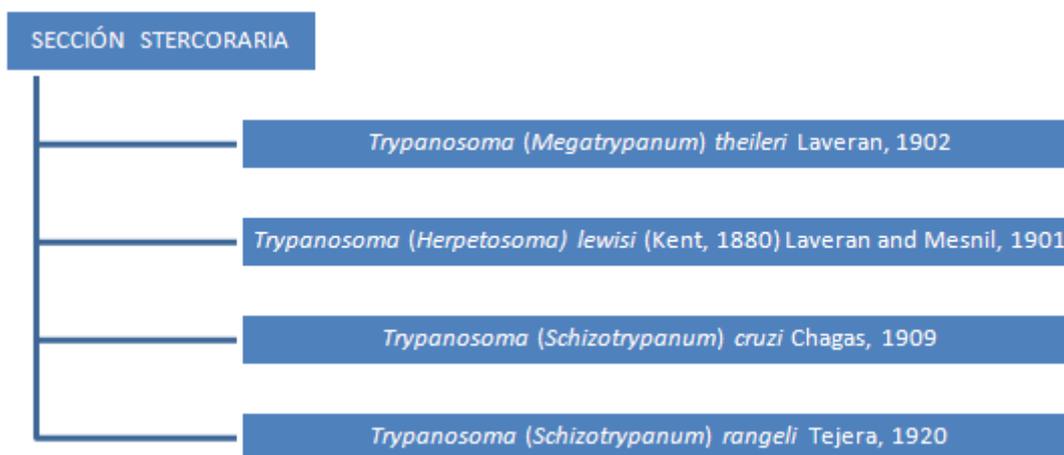
(B) sección Salivaria (subgénero *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon*), en la cual la transmisión es inoculativa desde la región anterior del aparato digestivo del insecto vector.

Las especies pertenecientes a la sección Salivaria, en virtud a los genes que codifican glicoproteínas variables de superficie (VSG), son los únicos tripanosomas que exhiben variación antigénica.

En los siguientes diagramas aparecen las especies de importancia veterinaria y médica, apareciendo clasificado *T. evansi* en la sección Salivaria.



**Figura 3.** Sección Salivaria. Adaptado de Stevens y Brisse (2004).



**Figura 4.** Sección Stercoraria. Adaptado de Stevens y Brisse (2004).

### 3. MORFOLOGÍA DE *Trypanosoma evansi*

#### 3.1 Generalidades

La morfología más común en la familia *Trypanosomatidae* corresponde a la que presentan los tripanosomas de mamíferos en la fase sanguínea (Itard, 1989). La forma evolutiva tripomastigote de los tripanosomas de mamíferos, es básicamente lanceolada, y con aspecto de hoja delgada y alargada, presentando una sección transversal elíptica con sus extremos en forma de puntas de cono (Hoare, 1972).

Generalmente *T. evansi* es monomórfico, aunque esporádicamente puede presentar polimorfismo (Hoare, 1954; Brun *et al.*, 1998). Morfológicamente es indistinguible de las formas delgadas de *T. brucei*, tanto de las que parasitan a humanos (*T. brucei brucei*) como a animales (*T. brucei rhodesiense* y *T. brucei gambiense*), así como tampoco puede distinguirse de *T. equiperdum* a nivel de microscopio óptico y electrónico (Brun *et al.*, 1998).

Aunque clásicamente se había establecido en 24 micrómetros la longitud media de *T. evansi* (Hoare, 1954), medidas más recientes indican variaciones en esta media, la cual guarda más relación con la especie hospedadora, que con el parásito en sí (Desquesnes, 2004). En las formas tripomastigotes de los tripanosomas, a modo de referencia topográfica y de acuerdo a Hoare (1972), será descrito como extremo anterior aquel hacia donde se dirige el parásito durante la locomoción. Los principales orgánulos de un tripanosoma son el núcleo, el kinetoplasto y el sistema mastigote representado por el cuerpo basal y el flagelo (Hoare, 1972).

#### 3.2. Flagelo

El único flagelo que presenta el parásito emerge del extremo posterior del cuerpo, con origen en el denominado cuerpo basal. Se dirige a lo largo de la superficie del cuerpo, como el margen del pliegue que forma la denominada membrana ondulante, hasta que alcanza el extremo anterior, donde puede quedar como flagelo libre (Hoare, 1972). La

parte libre del flagelo mide entre 3 y 5 micrómetros, y no está presente en las formas rechonchas (Desquesnes, 2004). El flagelo presenta el patrón clásico de organización de 9 pares de microtúbulos periféricos y un par central, y además en tripanosomátidos, como diferencia del resto de protozoos parásitos, está asociado al axonema un complejo de filamentos denominado estructura paraflagelar (de Souza, 2008).

### **3.3. Periplasto y envoltura de glicoproteínas**

El cuerpo del parásito está delimitado por una pared llamada periplasto, la cual comprende una membrana plasmática de 8-10 nm de espesor y, bajo ésta, una capa de microtúbulos peliculares (Itard, 1989). La membrana plasmática que envuelve se invagina formando el bolsillo flagelar, continuando a lo largo del flagelo (de Souza y da Cunha-e-Silva, 2003).

El cuerpo puede estar envuelto a su vez por una capa de glicoproteínas secretadas por la célula, que actúa como antígeno de superficie en las formas sanguíneas de los tripanosomas de mamíferos. Esta capa puede transformarse, lo cual le permite al parásito evadir la acción de los anticuerpos generados por los hospedadores mamíferos (Itard, 1989). Esta capa, denominada con las siglas VSG (glicoproteínas variables de superficie), presenta en *T. evansi* un peso molecular de 66-67 kDa (Ghorui y Srivastava, 1999). Estas VSG determinan los tipos antigénicos variables de los tripanosomas individuales, denominados VAT. La especie *T. evansi* presenta un repertorio limitado de VSG, teniendo un carácter predominante la glicoproteína RoTat 1.2 (Verloo *et al.*, 2001). Esto puede explicar la alta sensibilidad mostrada por test diagnósticos para detectar anticuerpos frente a *T. evansi*, realizados en distintos lugares del mundo y en distintos hospedadores, basados en el antígeno RoTat 1.2 (Diall *et al.*, 1994; Dia *et al.*, 1997b; Verloo *et al.* 1998; Davison *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2000; Verloo *et al.*, 2000).

Sin embargo, en estudios realizados en Kenia fue imposible detectar diversos casos de *T. evansi* a través de test basados en la VGS RoTat 1.2 (Ngaira *et al.*, 2003; Njiru *et al.*, 2004). Se concluyó que algunas cepas *T. evansi* en Kenia carecen del gen que codifica RoTat 1.2 y de su VSG asociada, observándose a su vez algunas poblaciones de *T.*

*evansi* que presentaban el gen, pero carecían de la citada VSG (Ngaira *et al.*, 2004). Estas cepas aisladas en Kenia que carecen de VSG RoTat 1.2 se denominan *T. evansi* non-RoTat 1.2 y poseen una VSG llamada JN 2118Hu (Ngaira *et al.*, 2005). No obstante el término non-RoTat 1.2 en referencia a las cepas VSG JN 2118Hu debe ser aplicado con cautela, teniendo en cuenta que la existencia de otros *T. evansi* que estén desprovistos de ambas glicoproteínas de superficie no ha sido descartada (Njiru *et al.*, 2010).

### 3.4. Citoesqueleto

Bajo el periplasto se encuentra el citoesqueleto del protozoo, conformado por microtúbulos, presentes en todas las células eucariotas, pero especialmente abundantes en la familia Trypanosomatidae (Rasooly y Balaban, 2004). Los microtúbulos individuales están compuestos de heterodímeros de tubulina, habiendo sido identificadas en *T. brucei* 6 tubulinas hasta el momento: alpha, beta, gamma, delta, epsilon y zeta (Gull, 2001). La unión de los microtúbulos individuales entre sí y con la membrana plasmática, a través de puentes cruzados, se produce por la presencia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Kohl y Gull, 1998).

La beta-tubulina es un importante miembro de la familia de tubulinas en las especies de la familia Trypanosomatidae, y además de estar presente debajo de la membrana plasmática, forma parte del flagelo, estructura paraflagelar y el huso mitótico. La secuencia de aminoácidos de la beta-tubulina en *T. evansi* presenta una homología del 100 % y del 99.8% con las de *T. equiperdum* y *T. brucei* respectivamente (Li *et al.*, 2007).

### 3.5. Citoplasma

El citoplasma contiene distribuidos al azar los ribosomas y el retículo endoplásmico, estando este último orgánulo unido a los microtúbulos del citoesqueleto. El complejo de Golgi se encuentra cerca de la bolsa flagelar (de Souza y da Cunha-e-Silva, 2003).

El núcleo de los tripanosomas pueden estar situado en diferentes partes del cuerpo, pero en las formas sanguíneas aparece cerca del centro o en la mitad anterior (Hoare, 1972).

El orden Kinetoplastida comprende un grupo de protozoos definidos por la presencia de un orgánulo característico, el kinetoplasto (Vickerman, 1976). Este orgánulo corresponde a una condensación de ADN extranuclear, y en tripanosomátidos se encuentra dentro de la única mitocondria ramificada, que se localiza frente al cuerpo basal que da lugar al flagelo (De Souza y da Cunha-e-Silva, 2003). En *T. evansi* el diámetro del kinetoplasto es de 0,7 micrómetros (Hoare, 1972).

El kinetoplasto de los tripanosomas está conformado por miles de moléculas circulares de doble cadena llamadas maxicírculos y minicírculos. La red del ADNk consiste en 50-100 maxicírculos y 5000-10000 minicírculos. Los maxicírculos corresponden al equivalente del ADN mitocondrial de otros eucariotas, y en ellos está codificada la información para la producción del ARN mitocondrial. En los minicírculos está codificado ARN mensajero que interviene en la definición de la producción final del ARN mitocondrial, a través de un proceso post-transcripcional en el cual se produce inserción y/o extracción de nucleótidos de uridina y es catabolizado por complejos multiprotéicos (Stuart, 2005).

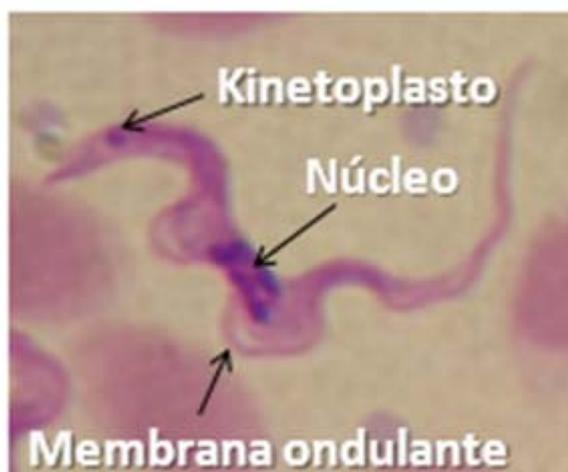
Se pueden producir alteraciones en el ADNk, de forma natural o inducidas en laboratorio (Schnauffer *et al.*, 2002). A tenor de las alteraciones que puede sufrir el kinetoplasto surgen los términos akinetoplástido y diskinetoplástido, haciendo referencia a la pérdida total o reducción en el tamaño del ADNk respectivamente, que pueden sufrir los tripanosomas. No obstante, se deben denominar diskinetoplástidos a todos aquellos stocks en los que no se ha realizado análisis del estado del kinetoplasto, debido a que tripanosomas aparentemente akinetoplástidos, pueden poseer un ADNk no condensado, no detectable por Giemsa (Ventura *et al.*, 2000). Existen tres especies incluidas dentro de la categoría de tripanosomas diskinetoplástidos/akinetoplástidos: *T. evansi*, *T. equinum* y *T. equiperdum* (Hoare, 1972). Clásicamente *T. equinum* fue considerada como una especie separada, y en la actualidad es considerada una forma de *T. evansi* (Ventura *et al.*, 2000).

*T. evansi* carece de maxicírculos en su ADNk y la secuencia de los minicírculos es muy similar entre cepas aisladas en diferentes partes del mundo (Borst *et al.*, 1987; Songa *et al.*, 1990; Lun *et al.*, 1992). Mientras que en *T. evansi* hay ausencia de maxicírculos, en *T. equiperdum* sí existen; según Lun *et al.* (2004), estos maxicírculos en *T. equiperdum* son incompletos, con respecto a los de *T. brucei*, especie a partir de la cual estos autores sugieren que se originó *T. equiperdum*.

Existen cepas de *T. evansi* akinetoplástidas de forma natural, habiendo sido descritas cepas desprovistas de ADNk tanto de animales domésticos como salvajes (Ventura *et al.*, 2000).

Aparte del kinetoplasto, en tripanosomátidos existen otros orgánulos característicos. En primer lugar se presenta el denominado glicosoma, que es un orgánulo por lo general redondo, y que contiene una matriz más densa que la del citoplasma. La mayoría de las enzimas de la vía glucolítica se localizan en este orgánulo. Dado que en algunas especies el glicosoma contiene catalasa y enzimas que intervienen en la beta-oxidación de los lípidos, se correspondería a un peroxisoma (De Souza y da Cunha-e-Silva, 2003).

Otro orgánulo característico es el acidocalcisoma, que consiste en varias vesículas distintivas, que suelen mostrar un vacío interior y un material electrodenso en su periferia. Este orgánulo está involucrado en la regulación de la concentración citoplasmática de calcio, con la participación de varias ATPasas (De Souza y da Cunha-e-Silva, 2003).



---

**Figura 5.** Morfología de *Trypanosoma evansi*.

## **4. CICLO DE *Trypanosoma evansi***

*T. evansi* presenta un ciclo de vida monoxeno, y su contagio se realiza de forma mecánica, sin que este protozoo sufra evolución en el tiempo que transcurre en la transmisión, entre un hospedador infestado y un nuevo hospedador. Esta diferencia con respecto a otros tripanosomas que sí presentan evolución durante la transmisión entre hospedadores, ha sido explicada en *T. evansi* por la pérdida de los maxicírculos del kinetoplasto (Borst *et al.*, 1987).

La multiplicación de *T. evansi* en sus hospedadores mamíferos se produce por fisión binaria longitudinal, y tiene lugar en sangre, linfa o líquido cefalorraquídeo (Fowler, 2010).

### **4.1. Formas de transmisión de *Trypanosoma evansi***

Se le ha atribuido un rol importante a especies concretas de artrópodos hematófagos en la transmisión mecánica de la surra, aunque también se han descrito otros modos de transmisión, sin la intervención de los mismos.

#### **4.1.1. Transmisión por picadura de vectores mecánicos**

En la transmisión de *T. evansi* generalmente intervienen un grupo determinado de insectos, que se comportan como vectores a tenor de sus hábitos hematófagos. Tras alimentarse de la sangre de animales parasitéticos, pueden transportar en sus piezas bucales tripanosomas que pueden presentar capacidad infestiva. El potencial transmisor de estos vectores depende del tiempo que transcurre hasta la siguiente alimentación sobre otro animal libre de la protozoosis y a su vez de la especie de vector involucrada. Las especies de insectos que transmiten la surra de forma mecánica, a través de la picadura, pertenecen a los géneros *Tabanus*, *Stomoxys*, *Atylotus* y *Lyperosia* (sinónimo de *Haematobia*) (Brun *et al.*, 1998). Estas especies se describirán de forma más detallada en el apartado 4.2.

#### **4.1.2. Transmisión por mordedura por *Desmodus rotundus***

En Sudamérica juegan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad los murciélagos vampiros (*Desmodus rotundus*), que por sus hábitos hematófagos se convierten simultáneamente en hospedadores, reservorios y vectores mecánicos de *T. evansi*. Así, estos quirópteros adquieren la infestación a través de la ruta orodigestiva, o incluso de forma percutánea por mordedura entre congéneres (Hoare, 1965; 1972).

Debido a que actúan tanto como vectores y como reservorio, existiendo multiplicación del parásito en dicho vector, existe justificación para considerar a los murciélagos vampiros como vectores biológicos (Desquesnes, 2004).

En Canarias habitan nueve especies de quirópteros, distribuidos de forma distinta por todas las islas (Martín González y García, 2004), y no existe la especie hematófaga *Desmodus rotundus*, circunscrita únicamente a Latinoamérica.

#### **4.1.3. Transmisión vía oral**

La transmisión vía oral, por alimentación de carne o sangre infestada ha sido demostrada en perros, gatos y ratones (Ray *et al.*, 1972; Raina *et al.*, 1985; Bazzoli *et al.*, 2002). En otros estudios se consiguió transmisión vía oral en ratas (*Rattus norvegicus*) pero no en ratones (*Mus musculus*) (da Silva *et al.*, 2007).

De acuerdo con Hoare (1972), los perros domésticos y salvajes están protegidos de los ataques de los vectores hematófagos por la cobertura de pelo, lo que sugiere que el contagio tiene lugar por comer cadáveres de ungulados infestados. Desquesnes (2004) cita este modo de transmisión como la principal ruta de adquisición de *T. evansi* en carnívoros en América, particularmente en perros.

Además, se cita también la posible importancia que puede tener esta vía de transmisión en otras especies salvajes de Sudamérica, como son las capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) y los coatís (*Nasua nasua*), los cuales tienen un comportamiento gregario y agresivo entre congéneres, pudiéndose mantener la infestación en el grupo, por peleas

entre individuos (Herrera *et al.*, 2004). De la misma forma, tal como se citó en el apartado anterior, la especie de murciélago *Desmodus rotundus* adquiere la infestación a través de la ruta orodigestiva, o incluso de forma percutánea por mordedura entre congéneres (Hoare, 1965; 1972).

#### **4.1.4. Transmisión iatrogénica**

La transmisión iatrogénica, la cual no ha recibido la atención adecuada, es otra ruta probable de contagio desde hospedadores subclínicos hacia hospedadores sanos, ya que se ha descrito la transmisión mecánica por agujas hipodérmicas contaminadas como vía posible para adquirir *T. evansi* (Ngeranwa y Kilalo, 1994; Fowler, 2010).

Prácticas colectivas como programas de vacunación, así como identificación a través de crotal en pabellones auriculares o tatuaje, sin las adecuadas medidas higiénicas, podrían ser medios de transmisión del protozoo (Ngeranwa y Kilalo, 1994; Reid, 2002).

#### **4.1.5. Transmisión vertical**

##### ***4.1.5.1. Transmisión transplacentaria***

Se han asociados abortos y mortalidad neonatal a brotes de *T. evansi*, pero se desconocen los mecanismos responsables de estos desórdenes reproductivos (Gutiérrez *et al.*, 2005).

No obstante, no parece tener importancia la transmisión congénita de *T. evansi*, a la vista de la poca información sobre el tema en la literatura científica. A este respecto, tomando fuentes bibliográficas no indexadas, ha sido citada la transmisión transplacentaria de *T. evansi*, al detectarse el protozoo en sangre de un feto de asno abortado (Pathak y Kapoor, 1999); y de forma experimental, también se observaron tripanosomas en fetos de ratas y ratones, pero no se observó en feto de chinchilla, procedentes de madres inoculadas (Latif *et al.*, 1986). En otro estudio no se observaron al microscopio *T. evansi* en la sangre de fetos de ratón cuyas madres habían sido

infestadas previamente, pero sí se demostró en posterior subinoculación, lo cual confirmó la transmisión transplacentaria (Sarmah, 1998).

#### **4.1.5.1. Transmisión lactógena**

Otro tipo de transmisión vertical que también está poco documentada para *T. evansi*, es el contagio a lactantes. De forma experimental, en animales de laboratorio, no se han podido obtener resultados que permitan incluirla como probable vía de contagio (Latif *et al.*, 1986).

## **4.2. Insectos vectores principales de *Trypanosoma evansi*. Situación en Canarias**

### **4.2.1. Géneros *Tabanus* y *Atylotus***

Los dípteros de la familia Tabanidae, en la cual se incluyen los géneros *Tabanus* y *Atylotus*, son bien conocidos por el hostigamiento que producen con sus picaduras al hombre y a muchos animales domésticos y salvajes. De esta forma, dentro de los insectos citados como posibles vectores de la surra, los que se consideran más importantes pertenecen al género *Tabanus* (Luckins, 1988; Luckins y Dwinger, 2004).

Las picaduras se producen como consecuencia de los hábitos hematófagos que tienen las hembras de la mayoría de las especies. Las hembras adultas pueden vivir de uno a dos meses, y necesitan la toma de sangre para la maduración de los huevos, teniendo lugar hasta cuatro tomas en intervalos de una semana o más, dependiendo de si es posible encontrar un hospedador (Portillo, 1984; Desquesnes, 2004). Los estímulos que dirigen a los tábanos a sus hospedadores son de tipo olfatorio, en particular el dióxido de carbono, y visual, teniendo una marcada preferencia por grandes animales, convirtiéndose la especie equina en un tipo de hospedador muy atractivo para este insecto (Desquesnes, 2004).

Un mecanismo como es la contaminación de las piezas bucales con sangre, que contiene las formas sanguíneas del parásito, es suficiente para asegurar la consiguiente potencial

transmisión mecánica de *T. evansi*, viéndose facilitado ello en los tábanos, porque presentan unas piezas bucales ásperas, que destacan en tamaño con respecto a los demás vectores potenciales, y unas labelas esponjosas (Foil, 1989; Sumba *et al.*, 1998).

Los tábanos atacan de forma vigorosa produciendo una reacción defensiva en su hospedador que espanta al insecto y lo obliga a atacar a un nuevo hospedador para completar su alimentación (Luckins y Dwinger, 2004). La alimentación interrumpida de sangre es el factor más importante, responsable del rol de los tabánidos como eficientes vectores mecánicos, aumentando la probabilidad de esta eficiencia con el aumento de interrupciones en la alimentación. Ello depende tanto del comportamiento hematófago inherente a cada especie de tábano, como de la interacción tábano-hospedador, definida en este segundo caso en mayor medida por el comportamiento del hospedador frente a los ataques. Así, se observan especies de tabánidos que completan su alimentación en un solo hospedador, haciéndolos menos eficientes como transmisores, frente a otras especies que necesitan más de un hospedador, lo que los convierte en vectores potenciales más eficaces. Los comportamientos defensivos de la especie hospedadora potencial, como pueden ser el movimiento de la cola, pataleo, sacudir la cabeza, espasmos dérmicos, entre otros, o la indiferencia frente al ataque del insecto, son factores que también definen el nivel de éxito de la transmisión, así como el perfil de vulnerabilidad que presenta la especie hospedadora (Muzari *et al.*, 2010).

Otro factor que condiciona el éxito de la transmisión por estos insectos es la distancia entre hospedadores potenciales. Así, el porcentaje de los tábanos que se mueven entre animales susceptibles, está inversamente relacionado a la distancia que los separa. Cuando se produce la alimentación de los tábanos sobre varios hospedadores, ocurre entre los animales del mismo rebaño, habiéndose observado este fenómeno con distancias de separación de hasta 25 metros. A pesar de que se han observado tábanos que recorren incluso kilómetros, el vuelo a largas distancias después de una alimentación interrumpida, no constituye la norma en el comportamiento hematófago del insecto en busca de nuevos hospedadores, por lo menos en un periodo de pocas horas (Barros y Foil, 2007).

La actividad de los tábanos es diurna, pero sin embargo el ritmo circadiano de los tábanos muestra tendencias distintas según el continente. Así, en África los tábanos

muestran mayor actividad después del mediodía y durante la tarde, cuando el tiempo es claro y sin viento, mientras que en Sudamérica la tendencia es durante la mañana y la puesta de sol (Dia *et al.* 1997c; Desquesnes, 2004).

También se observan diferencias en la presencia de picos de abundancia de tábanos según los periodos de lluvias y sequía en distintas localizaciones y continentes, y se relacionan con variaciones temporales en la seroprevalencia de *T. evansi* en las zonas estudiadas (Dia *et al.*, 1997c; Barros, 2001; Abdesalam *et al.*, 2002).

Así, en África se observaron picos de abundancia de tábanos al final de la estación lluviosa y comienzo de la estación seca (Dia *et al.*, 1997c; Abdesalam *et al.*, 2002). En contraste, en Sudamérica, según la localización, se observó mayor abundancia de tábanos tanto durante la estación lluviosa (Barros, 2001), como durante la estación seca (Desquesnes, 2004).

La última revisión llevada a cabo en España de la familia Tabanidae, registra 97 especies (Portillo, 1984; Portillo y Báez, 2002). En países africanos situados en latitudes próximas a las Islas Canarias, se ha descrito la presencia de tábanos en áreas prevalentes de surra en dromedarios, destacando *Atylotus agrestis* como la especie más abundante (Dia *et al.*, 1997c; Abdesalam *et al.*, 2002).

No obstante, en Canarias se ha citado poca abundancia de tabánidos, recogándose desde el punto de vista histórico que ya en 1866, Viera y Clavijo, en su “Diccionario de Historia Natural” decía: “por fortuna, no se conoce (el tábano) en nuestras islas”. En Canarias fueron descritas la especie endémica *Atylotus canarius* (Enderlein, 1929), y la especie *Tabanus fortunatus* (Frey, 1936), resultando esta última sinónima de la especie europea *Tabanus cordiger* (Meigen, 1820) (Báez y Portillo, 1981; Portillo y Báez, 2002; Báez y García 2004). Estas especies fueron descritas en las islas de Tenerife, Fuerteventura y Lanzarote, no encontrándose información de su existencia en las restantes islas del archipiélago (Báez y García, 2004).

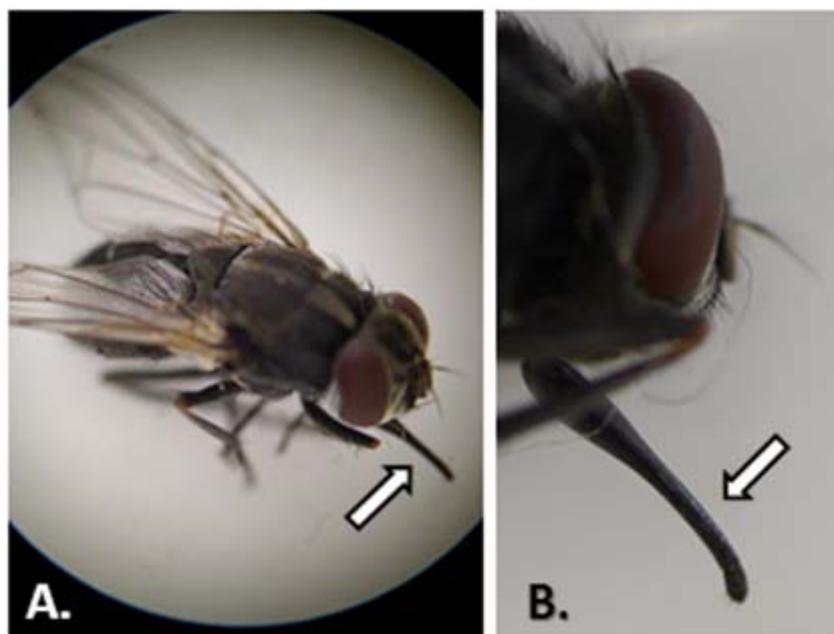
La mayoría de especies de climas templados tienen una única generación al año y los adultos viven durante 2-4 semanas (Wall y Shearer, 2010). Las condiciones óptimas de

reproducción para estos insectos incluyen temperaturas ambientales altas y constantes, entre 32-35°C, y disponibilidad de agua (Kettle, 1995).

#### 4.2.2. Género *Stomoxys*

Otros dípteros descritos como vectores mecánicos de *T. evansi*, son los incluidos dentro del género *Stomoxys* (Brun *et al.*, 1998). Este género contiene en torno a 18 especies, de las cuales la más común e importante en climas templados es *Stomoxys calcitrans*, conocida como mosca de los establos (Wall y Shearer, 2010).

Todas las especies de este género tienen un aparato bucal de tipo picador, teniendo una probóscide lo suficientemente prominente como para diferenciarlas de las especies del género *Musca*. A diferencia de los tabánidos, las especies del género *Stomoxys* presentan comportamientos hematófagos en ambos sexos y habitualmente realizan pequeñas ingestas de sangre de diferentes hospedadores, varias veces al día (Wall y Shearer, 2010).



**Figura 6.** *Stomoxys calcitrans*: (A) vista dorsal del cuerpo y (B) lateral de la cabeza. Nótese la probóscide (flechas).

Las condiciones óptimas para pupar para este género incluyen oscuridad absoluta y temperaturas de aproximadamente 27°C. La duración de su ciclo biológico en climas templados es de 4 semanas, pudiendo oscilar entre 3 y 7, dependiendo de la temperatura (Wall y Shearer, 2010).

Aunque se ha relacionado al género *Stomoxys* con la transmisión mecánica de la surra, en la literatura existe cierta controversia al respecto. De acuerdo a Ngeranwa y Kilalo (1994), *Stomoxys calcitrans* fue incapaz de transmitir *T. evansi* entre cabras, y de éstas a camellos, con unas condiciones experimentales incluso más adecuadas para la transmisión de la enfermedad que las presentes en el campo.

No obstante, de acuerdo a Moutia (1928), *Stomoxys nigra* es el principal vector de la surra en la isla Mauricio, situada en el océano Índico. Además indica que existen dos limitaciones para la transmisión con éxito: en primer lugar, el intervalo de tiempo transcurrido entre la alimentación de sangre por parte del vector sobre el animal infestado y la siguiente alimentación sobre el animal sano receptor, no debe ser superior a diez minutos; en segundo lugar, se cita que el animal donante debe presentar una alta parasitemia periférica.

En la misma línea, en un estudio experimental más reciente, en el que se utilizaba un modelo de laboratorio en ratón, se demostró la transmisión de *T. evansi* por *Stomoxys taeniatus* y *S. niger niger*. No obstante, sólo se observó un pequeño número de parásitos móviles en las piezas bucales de los dípteros estudiados, y por tanto, presumiblemente viables hasta 5-7 minutos tras la alimentación sobre un hospedador infestado (Sumba *et al.*, 1998).

Se observó también de forma experimental, la supervivencia de *T. evansi* con capacidad infestante en el intestino de estos insectos, hasta 2-3 horas tras alimentación de sangre parasitémica, y en un sólo caso se mantuvo esta capacidad infestante hasta 8 horas; no obstante, la transmisión como resultado de regurgitación no ha sido demostrado como un fenómeno natural (Sumba *et al.*, 1998).

En otro intento por demostrar la transmisión mecánica de *T. evansi* de forma experimental a ratones, se obtuvo un éxito por debajo del 1%, utilizando una cepa de *T.*

*evansi* que procedía de un ganado de camellos situado en una zona con gran cantidad de tábanos, algunos *Stomoxys* y sin presencia de moscas tse-tse. Además, la transmisión sólo fue lograda con una sola especie, *Stomoxys varipes* Bezzi, de entre nueve capturadas del género *Stomoxys* (Mihok *et al.*, 1995).

*Stomoxys calcitrans* es una especie cosmopolita, y también ha sido descrita su presencia en todas las Islas Canarias, probablemente apareciendo por introducción (Báez, 1981; Báez y García 2004). La especie afrotropical *Stomoxys niger* Macquart, 1851, fue descrita en las Islas Canarias por Séguy en el año 1935, pero no se han repetido descripciones, ni ha sido aceptada posteriormente, tratándose probablemente de un error en la identificación de *S. calcitrans* (Pont y Báez, 2002).

#### 4.2.3. Género *Haematobia* (*Lyperosia*)

Dentro de la subfamilia Stomoxynae se encuentran también los dípteros del género *Haematobia*, relacionados también con la transmisión de *T. evansi* (Brun *et al.*, 1998). En los climas templados se pueden encontrar dos especies de este género, *Haematobia irritans* (también denominada *Lyperosia irritans*) conocida como mosca de los cuernos, y *Haematobia stimulans* (también denominada *Haematobosca stimulans*) (Wall y Shearer, 2010).

Los adultos del género *Haematobia* son moscas similares en apariencia a las moscas de los establos. Los adultos de *Haematobia stimulans* son un poco más pequeños que los adultos de *Stomoxys calcitrans*, pero *H. irritans* es considerablemente menor, teniendo aproximadamente la mitad del tamaño de una mosca doméstica. Otra de las diferencias con *S. calcitrans* es que los palpos de los adultos de *Haematobia spp.* son más largos en relación con la probóscide (Wall y Shearer, 2010).

En cuanto al comportamiento que presentan, ambos sexos son hematófagos y se alimentan principalmente sobre ganado vacuno y búfalos, y ocasionalmente sobre otros animales, incluyendo a humanos estrechamente asociados a bovinos. Los adultos de *H. irritans* permanecen sobre su hospedador de forma permanente, abandonando al hospedador por un corto periodo de tiempo para copular y poner los huevos. Por el

contrario, *H. stimulans* no permanece tanto tiempo sobre el hospedador y tiene un comportamiento más parecido al de *S. calcitrans* (Kettle, 1995; Wall y Shearer, 2010).

En un estudio experimental realizado sobre la transmisión mecánica de *T. evansi* por *Haematobia minuta*, desde un camello infestado de forma natural a ratones, se obtuvo un nivel de éxito bajo, de un 2-3%, y se pudieron observar tripanosomas móviles hasta 3 minutos en la probóscide, y hasta 90 minutos en el intestino del insecto, tras la alimentación de sangre con el citado parásito. Después de alimentar a estos insectos con sangre parasitémica, se observó que inoculando ratones con material consistente en insectos homogenizados, la capacidad infestiva de *T. evansi* se mantuvo hasta una hora después (Oyieke y Rey, 2003).

En territorio peninsular español han sido descritas las especies *H. irritans* y *H. titillans* (Pont y Báez, 2002), pero las referencias acerca de especies de este género son poco claras en cuanto a su presencia en las Islas Canarias.

En Canarias fue descrita por Séguy la especie registrada como *Haematobia minuta* Bezzi, una especie afro tropical, que probablemente se refiriera a *H. titillans*; no obstante, hasta el momento esta identificación específica está pendiente de confirmación (Pont y Báez, 2002; Báez y García, 2004). De la misma forma, fue descrita la especie *Haematobia stimulans* en la isla de La Palma por Santos-Abreu en 1976, no habiendo sido citada tampoco posteriormente, ni habiendo sido posible su identificación con el material antiguo disponible (Báez, 1981).

### **4.3. Papel de otros insectos en la epidemiología de *Trypanosoma evansi***

#### **4.3.1. Género *Hippobosca***

*Hippobosca camelina* es otro insecto hematófago comúnmente encontrado en áreas habitada por camellos. No obstante, no se obtuvo éxito en un estudio experimental encaminado a investigar su capacidad para transmitir *T. evansi* (Oyieke y Rey, 2003).

Sin embargo, a pesar de no haberse podido lograr la transmisión, se detectaron tripanosomas móviles hasta 2 minutos en la probóscide, y hasta hora y cuarto en intestino del insecto, tras la alimentación sobre un camello infestado (Oyieke y Rey, 2003).

Además, se observó que inoculándole material consistente en insectos homogenizados a ratones, la infestividad de *T. evansi* se mantuvo hasta media hora tras la alimentación de *Hippobosca camelina* con sangre parasitémica (Oyieke y Rey, 2003).

No obstante, en Canarias y en el resto del país, sólo ha sido descrita *Hippobosca equina*, pero no *H. camelina* (Carles-Tolrrá y Báez, 2002; Báez y García, 2004).

#### **4.3.2. Otros insectos**

A pesar de que los mosquitos no han sido citados como transmisores de *T. evansi*, mediante técnicas de biología molecular se ha detectado material genético del tripanosoma en mosquitos procedentes de granjas de cerdos en Tailandia (Chansiri, 2002).

Teniendo en cuenta además la información referente a la transmisión de otros varios agentes por parte de algunas especies de mosquitos y otros artrópodos hematófagos (pulgas, piojos, etc.), junto a la habilidad que muestran de pulular de forma ocasional, parece probable que jueguen un papel local o temporal en la transmisión de *T. evansi*. No obstante, la importancia de los mismos no ha sido evaluada, ni es generalizada (Desquesnes, 2004).

#### **4.4. Animales hospedadores potenciales de *Trypanosoma evansi***

*Trypanosoma evansi* es el tripanosoma animal de mayor distribución mundial, y afecta al ganado en Asia, África, América Central y del Sur, siendo distinto el principal hospedador según la localización geográfica (Luckins y Dwinger, 2004).

Se han establecido dos grupos de especies hospedadoras de *T. evansi*, según el nivel de susceptibilidad a padecer la surra: “Especies altamente susceptibles” y “Especies susceptibles” (NTTAT, 2009).

Dentro de la categoría de “Especies altamente susceptibles” se encuentran incluidos camélidos (*Camelus spp.*), equinos y perros (NTTAT, 2009).

En dromedario, la surra es la causa más importante de morbilidad y mortalidad, y también el factor de mayor trascendencia que produce pérdidas económicas en las zonas de cría de camello (Enwezor y Sackey, 2005). Los equinos son también considerados “altamente susceptibles” a tripanosomosis por *T. evansi* y han sido citadas infestaciones naturales en estos animales (Herrera *et al.*, 2004). En perros también han sido citadas infestaciones naturales por *T. evansi* en Latinoamérica (Herrera *et al.*, 2004; Franciscato *et al.*, 2007; Correa-Salgado *et al.*, 2010) y Asia (Singh *et al.*, 1993). En Europa se ha descrito un caso de una infestación compatible con *T. evansi* en un perro importado de Nepal (Hellebrekers y Slappendel, 1982).

En otro carnívoro doméstico como es el gato, aunque está probada la susceptibilidad a nivel experimental a *T. evansi* (Silva *et al.*, 2010a), la infestación natural se ha descrito con poca frecuencia en la bibliografía. Se han citado infestaciones naturales en tres gatos domésticos, proponiéndose *T. evansi* como el agente causal tras diagnóstico por frotis con sangre fresca (Tarello, 2005). Todas las descripciones de infestaciones naturales descritas en felinos tienen en común que se han realizado en Asia, afectando también a otras especies distintas de la especie *Felis catus* (Dakshinkar *et al.* 2002, Manohar *et al.*, 2003),

Dentro de la categoría de “Especies susceptibles” figuran búfalos de agua (*Bubalus spp.*), el ganado vacuno, ciervos, ovejas, cerdos y cabras (NTTAT, 2009).

Tanto en Sudamérica como en Asia han sido descritas infestaciones naturales por *T. evansi* en búfalo (Verloo *et al.*, 2000; Herrera *et al.*, 2004). Sin embargo no se han encontrado referencias de infestación en búfalo africano (*Syncerus caffer*), y se ha citado que no se ve afectado por *T. evansi*, viéndose implicado únicamente el búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) (Uilenberg, 1998).

En África y en Latinoamérica se considera a *T. evansi* como un patógeno leve o insignificante para el ganado vacuno, siendo diferente la situación que acontece en Asia, donde presenta importancia médica y económica en esta especie y se ha confirmado la enfermedad empleando diversos métodos diagnósticos (Desquesnes *et al.*, 2009a; Pruvot *et al.*, 2010). No obstante, de acuerdo a Mekata *et al.* (2009), la situación epidemiológica de la tripanosomosis bovina en Latinoamérica puede presentar diferencias de acuerdo a las variaciones regionales en la distribución de los protozoos, habiéndose observado una mayor diversidad de los genes que codifican receptores de transferrina en las cepas sudamericanas que en las asiáticas, lo cual podría determinar diferencias en la habilidad de las distintas cepas para adaptarse a diferentes hospedadores.

Reid *et al.* (1999) contrastaron el comportamiento de la parasitemia en el cerdo con la que mostró el ganado vacuno frisón en estudios de otros autores, y observaron durante los primeros meses tras una infestación un patrón similar en ambas especies, con más días mostrando aparasitemia que días con parasitemia.

Como reservorios para *T. evansi* podrían intervenir especies cinegéticas (NTTAT, 2009). A este respecto, de acuerdo a Reid *et al.* (1999), en Indonesia se citó como reservorio de la enfermedad a una especie de cérvido, que destaca en este sentido sobre los cerdos salvajes. Los cerdos salvajes, mostraron una alta tolerancia al protozoo sin apreciarse sintomatología, observándose parasitemias bajas y oleadas parasitémicas con intervalos entre picos de hasta veinte días. Este patrón menos marcado que la especie de cérvido también estudiada, hace de esta forma al cerdo comparativamente una especie menos efectiva como reservorio en Indonesia.

En una zona endémica de tripanosomosis por *T. evansi* de Brasil, a principios de la década pasada se realizaron dos estudios de campo que incluyeron también suidos salvajes: en el primero de ellos no se detectó parasitemia (Herrera *et al.*, 2004) y en el segundo a pesar de que sólo se detectó parasitemia por PCR, se les atribuye un importante rol en el mantenimiento de *T. evansi* (Herrera *et al.*, 2008).

Continuando con especies cinegéticas, pero en este caso de caza menor, no se han encontrado referencias acerca de infestaciones naturales en conejos silvestres por este

mismo protozoo, por lo que el significado de esta especie en la epidemiología de esta enfermedad es desconocido. Reglero *et al.* (2007), describieron una infestación por *Trypanosoma spp.* en conejos salvajes al sur de la Península Ibérica, pero no fue identificada la especie, sugiriéndose que fuera *Trypanosoma nabiasi*, la especie aceptada que infesta a conejo salvaje y doméstico y se transmite a través de la ingestión de pulgas o de heces de este insecto.

De acuerdo a Uche *et al.* (1992), los conejos son resistentes a la infestación por *T. evansi*. En una infestación experimental se sugirió que los conejos son refractarios al parásito, al observarse que *T. evansi* desaparece del torrente sanguíneo después del día ochenta y dos tras inoculación, restableciéndose también los parámetros hematológicos que se mantenían alterados durante la etapa de presencia de parasitemia (da Silva *et al.*, 2008a). En otra infestación experimental en conejos se observó que la parasitemia desapareció a los noventa días post-inoculación, observándose variaciones irregulares de parasitemia (da Silva *et al.*, 2009a).

Los pequeños rumiantes se han asociado a menudo a los hábitats de los dromedarios, así como también ocurre en algunos otros lugares del mundo, donde podrían ser reservorios del protozoo (Gutiérrez *et al.*, 2010). En el este de África se ha citado la probabilidad de que cabras y ovejas puedan ser hospedadores probables de *T. evansi*, cuando se crían en rebaños con dromedarios, y se ha demostrado, tras la inoculación experimental, que las cabras pueden cursar con un cuadro severo (Ngeranwa *et al.*, 1993). No obstante, en el noroeste africano, concretamente en el sur de Mauritania, tras estudios de campo se ha descartado el rol que pueden desempeñar los pequeños rumiantes en la epidemiología de la tripanosomosis por *T. evansi* en camellos, a pesar de haberse demostrado susceptibilidad de forma experimental a la cepa del lugar, mostrándose una clínica de abortos y pérdida de peso en ovino, y un curso generalmente subclínico en caprino (Jacquiet *et al.*, 1993).

Por otro lado, pueden ser considerados como importantes reservorios de la enfermedad en Latinoamérica la capibara (*Hydrochoerus sp.*), el coati (*Nasua sp.*) y el murciélago vampiro (*Desmodus sp.*) (NTTAT, 2009).

Exceptuando a la capibara, que es también un roedor, pero sólo presente de modo salvaje en Sudamérica, no existe demasiada información disponible en la bibliografía acerca del rol que desempeñan los roedores silvestres en la epidemiología de infestaciones naturales por *T. evansi*. No obstante, los roedores presentan susceptibilidad a *T. evansi* y además son usados a menudo como modelo para diagnóstico a través de inoculación (OIE, 2011). Además, se ha confirmado la posibilidad de la infestación por *T. evansi* en roedores a través de la vía oral (Raina *et al.*, 1985; da Silva *et al.*, 2007).

## **5. PATOLOGÍA DE LA INFESTACIÓN POR *Trypanosoma evansi***

### **5.1. Manifestaciones clínicas**

#### **5.1.1. Generalidades**

Los signos clínicos típicos de surra descritos son fiebre intermitente, anemia, emaciación, edema, conjuntivitis y epífora, linfadenomegalia, esplenomegalia, daño en la función motora y abortos (Taylor y Authié, 2004). El edema se puede observar en la región intermandibular, las extremidades, el abdomen (Desquesnes, 2004) e incluso en algunas especies se ha descrito en tejidos de la cara, párpados y orejas (Da Silva *et al.*, 2009a; 2010a).

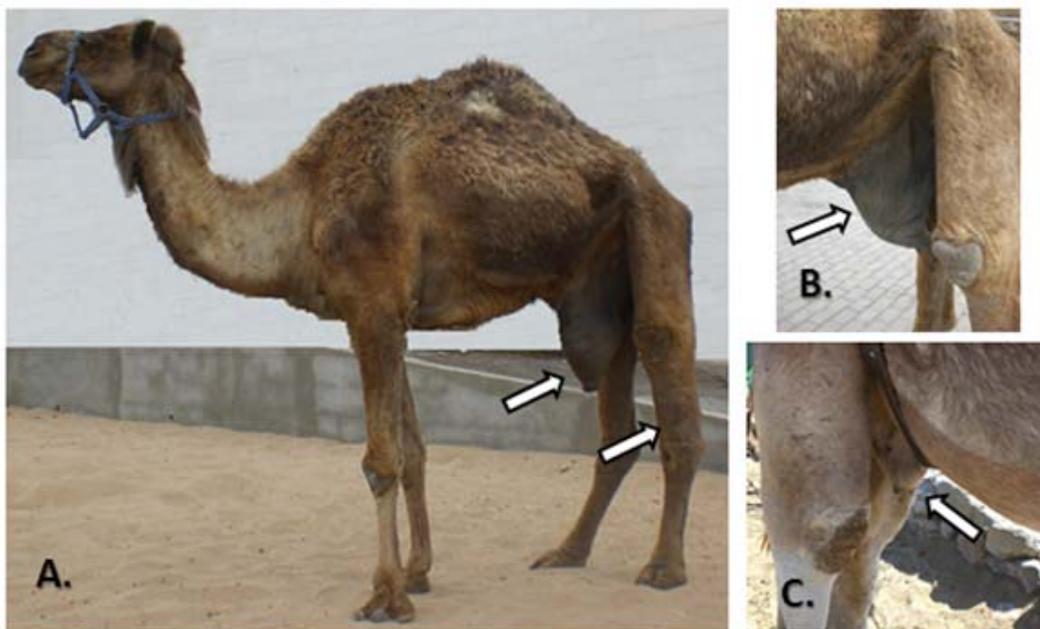
Otro amplio grupo de signos clínicos han sido atribuidos a la infestación por *T. evansi*, incluyendo sialorrea, diarrea, ictericia, descarga nasal mucopurulenta, disnea, alopecia, urticaria, infertilidad, disminución en la producción lechera en vacuno, debilidad, incoordinación y parálisis (Luckins y Dwinger, 2004).

Cuando los parásitos acceden al sistema nervioso central y al humor acuoso, se pueden observar síntomas neurológicos y hemorragia ocular (Desquesnes, 2004). Los signos neurológicos podrían ser observados en los estadios tardíos de la enfermedad (Taylor y Authié, 2004). En casos de tripanosomosis cerebral los animales muestran signos de torneo, excitación, comportamiento agresivo, ataxia, paresia de miembros pelvianos, decúbito lateral, convulsión y finalmente muerte (Luckins y Dwinger, 2004).

La enfermedad puede presentarse de forma aguda en animales jóvenes y hembras preñadas, los cuales mueren en pocas semanas, pero en zonas endémicas la presentación común de la enfermedad es la forma crónica que cursa durante años y conduce a caquexia y muerte del animal (Taylor y Authié, 2004). Factores tales como el estrés por transporte, situaciones climáticas adversas, deficiencias nutricionales, cambios fisiológicos y enfermedades concurrentes, puede dar lugar a tripanosomosis clínica en animales con infestaciones latentes (Luckins y Dwinger, 2004).

### 5.1.2. Manifestaciones clínicas en camélidos

La surra en camellos es una enfermedad crónica debilitante, que presenta un impresionante desarrollo de síntomas clínicos aparentes alrededor del mes de la infestación. Se presentan episodios agudos de fiebre, asociada con apatía, falta de apetito y epífora, coincidiendo con los picos de parasitemia elevada. Poco a poco, el animal pierde condición, la joroba se encoge y aparece debilidad progresiva. Se pueden producir edemas. Las hembras preñadas a menudo abortan. La enfermedad por lo general suele ser mortal, a veces con bastante rapidez en un par de semanas o más a menudo unos pocos meses después de su comienzo; no obstante la evolución es mucho más a menudo crónica, y puede durar hasta dos o tres años. En los casos crónicos suele ser muy difícil encontrar los parásitos en la sangre por medios directos (Uilenberg, 1998).



**Figura 7.** (A) Dromedario afectado por surra de forma crónica: nótese el adelgazamiento, atrofia de la joroba y edema en prepucio y extremidades pelvianas. (B) Edema prepucial en dromedario macho afectado por *T. evansi*. (C) Prepucio normal en dromedario macho.

Los casos agudos a menudo muestran signos de fiebre recurrente acompañada de anemia progresiva y pobre condición corporal, pudiéndose desarrollar también edema y parálisis. Los casos subagudos acontecen con fiebre, edema, emaciación y alta mortalidad. El edema varía desde placas en el cuello y flancos a edema en hocico, pared torácica, prepucio y escroto y en las piernas hasta las rodillas y los corvejones (Wernery y Kaaden, 2002).

La surra crónica en camellos se caracteriza por anemia, edema y emaciación, e intermitentes episodios de fiebre, entre los cuales el parásito podría estar ausente en los vasos sanguíneos periféricos (Fowler, 2010). Se pueden producir nacimientos prematuros, abortos y disminuir la producción de leche. Algunos camellos pueden recuperarse espontáneamente (Wernery y Kaaden, 2002).

En camellos, la infestación por *T. evansi* se complica a veces por infecciones pulmonares (Taylor y Authié, 2004), así como en esta misma especie, este protozoo ha sido implicado como factor predisponente en brotes causados por *Clostridium perfringens* (Luckins y Dwinger, 2004). En la forma crónica de la enfermedad, dependiendo de los cuidados proporcionados al animal, la supervivencia podría ser hasta de tres o cuatro años (Fowler, 2010).

### **5.1.3. Manifestaciones clínicas en equinos**

Los caballos son considerados como una especie altamente sensible a la enfermedad (OIE, 2010). Los asnos, sin embargo, suelen padecer infestaciones crónicas o asintomáticas y podrían actuar como reservorios de la enfermedad (Taylor y Authié, 2004).

En los caballos se han descrito muchos signos clínicos comunes a otras especies animales, como palidez de mucosas, ictericia, linfadenomegalia superficial, edema (submandibular, prepucial, y abdominal ventral), hemorragia o derrame conjuntival y abortos (Marques *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2005). Se ha observado que caballos que se recuperaron de la enfermedad continuaron con una mala condición corporal (Rodrigues *et al.*, 2005). En caballos afectados por la forma crónica de la surra se ha

descrito emaciación progresiva, a pesar de que los animales presentaron apetito voraz (Rodrigues *et al.*, 2005), y en algunos casos se observó apetito reducido (Marques *et al.*, 2000).

Los términos “mal de caderas” y “derrengadera”, utilizados en Sudamérica para definir la enfermedad producida por *T. evansi*, hacen alusión a la sintomatología neurológica y debilidad que presentan los caballos en los cuartos traseros, y que se manifiestan a través de ataxia, ceguera, torneo, hiperexcitabilidad, decúbito lateral, déficits propioceptivos (mostrado por andar vacilante y pasos descoordinados e inestables), caída y desvío de la cabeza y “posición de perro sentado” (Marques *et al.*, 2000; Rodrigues *et al.*, 2005). Se observó que la “posición de perro sentado” la adoptaron los animales cuando fueron sometidos a un esfuerzo físico, siendo incapaces de soportar peso en los cuartos traseros, y después de algunos minutos, y a pesar de la gran dificultad, los animales pudieron levantarse y permanecer en estación (Marques *et al.*, 2000).

#### **5.1.4. Manifestaciones clínicas en especies rumiantes ganaderas**

El ganado vacuno se comporta a menudo como portador asintomático en Sudamérica, mientras que desarrolla formas crónicas de la enfermedad en Asia (Taylor y Authié, 2004). En novillas frisonas infestadas con una cepa indonesia de *T. evansi* se observó aumento de la temperatura corporal, anemia y disminución en la ganancia de peso, observándose en algunos casos una capacidad de ingesta reducida (Payne *et al.*, 1992). El ganado bovino raramente se ve afectado de forma grave, pero el parásito puede tener una influencia negativa en la fertilidad y las razas lecheras no pueden alcanzar su potencial de producción (Uilenberg, 1998).

Las formas agudas de la enfermedad pueden ocurrir en búfalo y en ganado bovino en las zonas donde se presenta la enfermedad por primera vez. Incluso en las zonas endémicas, *T. evansi* puede causar anemia y pérdida de la condición corporal de búfalos, y aunque la infestación no suele ser fatal, la enfermedad puede tener una gran importancia económica. Los animales de tiro son particularmente propensos a los efectos de la infestación (Uilenberg, 1998).

Aunque las infestaciones experimentales pueden causar la enfermedad en los pequeños rumiantes, a nivel de campo las ovejas y las cabras no se ven afectadas frecuentemente de forma grave (Uilenberg, 1998). La enfermedad ha sido descrita en pequeños rumiantes de forma subclínica, moderada y severa, describiéndose parasitemia errática, pérdida de peso y una caída significativa del hematocrito (Gutiérrez *et al.*, 2006a).

En ovejas, los síntomas de la enfermedad que se han descrito incluyen anemia, palidez de mucosas, epífora, pérdida de apetito, emaciación, inapetencia y aspecto áspero de la lana junto a pirexia fluctuante que en la mayoría de los casos coincidió con los picos de parasitemia. Se describieron dos formas distintas de la enfermedad: por un lado se observó una forma aguda, con una supervivencia dentro de los primeros 14 días tras la infestación; por otro lado se mostró la forma crónica, con una supervivencia de casi dos meses (Audu *et al.*, 1999a).

Cabras inoculadas de forma experimental con *T. evansi* procedente de un camello, mostraron un curso de la enfermedad subclínico, con unos pocos episodios de fiebre en las primeras semanas y artritis a los seis meses post-inoculación (Gutiérrez *et al.*, 2004a). Además se observó ulceración corneal en un caso, que tras tratamiento con droga tripanocida remitió totalmente, y otro caso de retinocoroiditis que persistió sin evolución (Morales *et al.*, 2006).

A pesar de que no existen signos patognomónicos, signos clínicos como progresiva pérdida de peso, membranas mucosas pálidas, pelo áspero, temperatura corporal fluctuante y anemia, junto a otros signos menos frecuentes como tos, aumento testicular y diarrea, podrían indicar infestación por *T. evansi* en cabras en zonas endémicas de surra, pero el diagnóstico definitivo no se puede confirmar sin detección de tripanosomas en sangre (Dargantes *et al.*, 2005a).

En búfalos infestados por *T. evansi* se observaron membranas mucosas anémicas, depresión, debilidad, intolerancia al ejercicio, pérdida de apetito y emaciación (Damayanti *et al.*, 1994).

### **5.1.5. Manifestaciones clínicas en carnívoros domésticos**

Tanto en Sudamérica como en Asia existen descripciones de la enfermedad en perros, que presentan la forma aguda con signos clínicos oculares, vasculares y neurológicos (Taylor y Authié, 2004). Varios autores han descrito signos clínicos comunes en perros que incluyen anemia de moderada a severa, fiebre, emaciación progresiva e inapetencia, y además se observaron algunos casos de conjuntivitis, linfadenomegalia palpable, edema en las extremidades y un inicio gradual de paresia en los cuartos traseros (Silva *et al.*, 1995; Aquino *et al.*, 1999; Franciscato *et al.*, 2007).

Da Silva *et al.* (2010a) observaron de forma común apatía, debilidad, hiporexia, edema palpebral y caquexia en gatos infestados de forma experimental por *T. evansi*; en menor grado aparecieron además otros signos como vómitos, palidez de mucosas, diarrea, deshidratación superior al 6% y áreas alopécicas en la cara. En menos del 50 % se observó anorexia, mucosas congestivas, conjuntivitis, opacidad corneal, respiración abdominal, edema de los tejidos de la cara, piel seca, rigidez, mortalidad y ya por último en menor proporción, por debajo del 30% se registraron arritmias, edema de extremidades, abscesos y enfisema subcutáneo.

### **5.1.6. Manifestaciones clínicas en otras especies animales**

En suidos y cérvidos salvajes inoculados experimentalmente con *T. evansi* no se observó indicios de la enfermedad ni disminución notable del apetito. Tras una parasitemia estable al inicio, en ambas especies se produjo un patrón fluctuante de parasitemia con repetidos picos, siendo el inicio de este patrón más temprano en los cerdos salvajes (Reid *et al.*, 1999).

En coatis (*Nasua nasua*) infestados experimentalmente con *T. evansi* se observó de forma común emaciación progresiva y aumento de ganglios linfáticos, y en algunos casos fueron descritos depresión, letargia y moderada ftofobia. No se detectó fiebre, no existiendo correlación entre la temperatura y la parasitemia (Herrera *et al.*, 2001).

En conejos infestados por *T. evansi* se observó anorexia, apatía, mucosas pálidas y edema en pabellones auriculares y párpados, con disminución en la ganancia de peso, aunque no se produjeron muertes como consecuencia de la parasitosis (da Silva *et al.*, 2009a). En otro estudio en esta especie Barman *et al.* (2010) observaron un registro regular de la temperatura, que presentó aumentos a los días 14 y 31 post-inoculación; además se produjo conjuntivitis purulenta, inflamación y edema en nariz, párpados y escroto, con descarga nasal y en pene, que progresó a ulceración e incluso a desprendimiento; se observó eczema en algunos casos, presentándose de forma generalizada emaciación y caquexia que aumentaba con el progreso de la enfermedad junto con edemas en varias zonas corporales, así como asfixia pasado un mes, y en algún caso opacidad corneal unilateral; además dichos autores registraron muerte de los animales infestados a los 43-86 días tras la inoculación.

En ratones infestados experimentalmente por *T. evansi* se observó palidez corneal que aumentó con el avance de la parasitemia, reducción del apetito pero invariable y no en todos los animales, apatía y pelo áspero que progresó a pelo erizado, descarga ocular, nasal y de pene en algunos casos a los 3 días post-inoculación; la mayoría de los animales estiraban su cuerpo todo lo posible. En el estadio final los ratones se movía desorientados, paraban y volvían a moverse, por último saltaban y morían en decúbito lateral o dorsal, dentro de las 80-96 horas tras la inoculación (Barman *et al.*, 2010). En capibara, *Hydrochaeris hydrochaeris*, el mayor roedor del mundo que habita en Sudamérica y que actúa de reservorio de *T. evansi*, no se observaron signos clínicos en una infestación experimental con dicho protozoo (Franke *et al.*, 1994).

En conejillo de indias los signos clínicos se observaron entre las 3-4 semanas post-inoculación y se produjeron dos picos de temperatura corporal en el primer mes; se observó emaciación, palidez conjuntival, y estornudos y asfixia después del día 25 post-inoculación, con muerte registrada entre los días 38-61 post-inoculación (Barman *et al.*, 2010).

Se han descrito tripanosomosis en félidos salvajes en la India. En gato de la jungla o de los pantanos (*Felis chaus*) infestado por *T. evansi* se observó opacidad corneal bilateral, con descara serosa y fotofobia (Dakshinkar *et al.*, 2002). En un tigre afectado por *T. evansi* se observó anorexia, estreñimiento y letargia, taquipnea y jadeo, taquicardia,

aumento de la temperatura corporal, tendencia a la inclinación de la cabeza para presionar contra las barras de la jaula y también se presentaron convulsiones (Upadhye y Dhoot, 2000).

En un elefante infestado por *T. evansi* se observó disminución de la condición corporal, reluctancia al trabajo y somnolencia diurna con mayor frecuencia de lo habitual, presentándose valores de glucosa en sangre fluctuantes, pero sin alteración en otros valores bioquímicos y hematológicos (Rodtian *et al.*, 2004).

En rinocerontes de Sumatra (*Dicerorhinus sumatrensis sumatrensis*) afectados por *T. evansi* se observó letargia, depresión, anorexia, debilidad que progresó a paresis posterior, disnea, decúbito y muerte (Vellayan *et al.*, 2004).

En osos del Himalaya (*Selenarctos thibetanus*) afectados por *T. evansi* se observó pirexia, inapetencia, depresión, taquicardia, taquipnea, membranas mucosas pálidas, somnolencia; se presentó en unos casos imposibilidad de ponerse en pie permaneciendo acostados, y en otros casos caminaron cortas distancias si se les ayudaba, presentando fasciculaciones de cuartos traseros y ataxia. En un caso se observó crepitaciones a la auscultación de pulmones (Muhammad *et al.*, 2007).

Aunque *T. evansi* se ha descrito en mamíferos, tras inoculaciones experimentales de este parásito en aves, concretamente en adultos y pichones de paloma (*Columba livia*), se observó únicamente parasitemia en los pichones y ésta desapareció dentro de los diez días tras la inoculación, con detección de un aumento de la temperatura coincidente con la parasitemia; además se observó una disminución en la concentración de hemoglobina y una inflamación negruzca en torno a 0,5 cm de diámetro en el punto de la inyección bajo el ala, sin observarse otros signos clínicos en los pichones infestados (Mandal *et al.*, 2008). En inoculaciones de pollos con *T. evansi* se produjo desarrollo de parasitemia en algunos animales, produciéndose muerte después de algunos días, sin aparecer manifestaciones clínicas en ninguno de los animales infestados (Misra *et al.*, 1976).

### **5.1.7. Confusiones clínicas con otros tripanosomas patógenos distintos de *T. evansi***

Dado que no existen signos clínicos patognomónicos de la enfermedad, en zonas donde coexisten varias especies del género *Trypanosoma* sería necesario identificar la/s especie/s implicada/s en los distintos brotes. Algunas especies que podrían producir confusión clínica con *T. evansi* son *T. lewisi*, *T. theileri*, *T. vivax* y *T. equiperdum*.

#### **5.1.7.1. *Trypanosoma lewisi***

A pesar de que *a priori* *T. lewisi* se describe como parásito estricto de ratas, ha rebasado la frontera hospedador-específico ya que se han descrito casos en pacientes humanos (Lun *et al.*, 2009). Incluso se ha observado la infestación accidental en ratas de laboratorio pertenecientes a un animalario de experimentación, citándose las pulgas de roedores silvestres como la más probable fuente de contagio (Desquesnes *et al.*, 2002)

Además del potencial antropozoonótico descrito, no se ha encontrado en la bibliografía científica descripción de infestaciones por *T. lewisi* en otras especies animales distintas a roedores. No obstante, se han observado bebés humanos afectados por *T. lewisi* que presentaron sintomatología clínica inespecífica como son edema grave, fiebre, anorexia y depresión (Howie *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2007; Sarataphan *et al.*, 2007).

#### **5.1.7.2. *Trypanosoma theileri***

*Trypanosoma theileri* es considerado como un hemoparásito del ganado vacuno y se han descrito infestaciones por este parásito en muchos países del mundo, incluyendo España (Villa *et al.*, 2008). Aunque se considera que *T. theileri* presenta bajo grado de patogenicidad, en situaciones de estrés puede crear confusión clínica al haberse observado signos clínicos inespecíficos como anemia, rigidez, depresión, aborto, diarrea y atonía ruminal en bóvidos afectados (Levine *et al.*, 1956; Ward *et al.*, 1984).

#### **5.1.7.3. *Trypanosoma vivax***

*Trypanosoma vivax*, originario de África y extendido al continente sudamericano con la introducción de ganado vacuno africano, presenta unas manifestaciones clínicas parecidas a la surra, con signos clínicos de anemia, pérdida de peso y debilidad, debiéndose tener en cuenta en áreas donde coexiste con *T. evansi*, que el diagnóstico puede ser solamente determinado a nivel de laboratorio (Desquesnes, 2004).

#### **5.1.7.4. *Trypanosoma equiperdum***

*Trypanosoma equiperdum* es un protozoo descrito en ganado equino. Este tripanosoma produce la enfermedad llamada durina y tiene una amplia distribución geográfica. Presenta signos clínicos principalmente en la fase tardía, con manifestaciones parecidas a la surra tales como fiebre, anemia, sintomatología neurológica y abortos, no pudiéndose utilizar por tanto la patogenicidad como medio de diferenciación con *T. evansi*. La mayor diferencia clínica entre estas dos especies sería que *T. evansi* es un parásito sanguíneo que se difunde por todo el organismo, mientras que *T. equiperdum* parasita usualmente al principio de la infestación los tejidos de los órganos genitales, causando signos clínicos locales como inflamación y edema (Brun *et al.*, 1998).

#### **5.1.7.5. *Trypanosoma spp. con estrictas especificidades geográficas***

Otras especies de tripanosomas presentan estrictas especificidades geográficas, y al igual que la surra se muestran también con signos clínicos inespecíficos.

En la enfermedad de Chagas, producida por *T. cruzi* y presente en el continente americano se producen signos cardíacos en pacientes humanos y también en algunas especies animales como los perros; sin embargo, las alteraciones oculares son producidas de forma más frecuente en animales afectados por *T. evansi* en el continente sudamericano (Desquesnes, 2004).

Dentro del área de distribución de la mosca tse-tse circunscrita a un territorio concreto del continente africano se desarrollan especies patógenas como *T. uniforme*, *T. congolense*, *T. simiae*, *T. suis*, y *T. brucei* y sus subespecies (Itard, 1989), caracterizados también por una clínica inespecífica.

## **5.2. Hallazgos laboratoriales**

### **5.2.1. Hematología**

En los siguientes subapartados se expondrán las alteraciones hematológicas descritas en las diferentes especies animales, tanto en la infestación de forma natural como experimental.

#### ***5.2.1.1. Hematología. Alteraciones de la serie roja***

La alteración hematológica más importante que aparece en el transcurso de la enfermedad es la anemia, con bajos recuentos eritrocitarios. La respuesta fisiológica a la anemia persigue el mantenimiento de la homeostasis en el organismo, pero puede depender de la especie, características individuales, condiciones específicas de la infestación, tratamientos u otros.

##### ***5.2.1.1.1. Camélidos***

En camélidos, la respuesta a la anemia puede incluir anisocitosis, policromasia, reticulocitos y eritrocitos nucleados, pero sin embargo la respuesta no es tan predecible como en otras especies, observándose además dacrocitos o eritrocitos con forma de lágrima asociados a anemias por deficiencia de hierro (ver apartados 5.2.1.5. y 5.4.5.), entre otras etiologías (Tornquist, 2010). Algunos hallazgos como anisocitosis y glóbulos rojos inmaduros circulantes, observados en dromedarios infestados, indicarían una respuesta regenerativa frente a la anemia (Gutiérrez *et al.*, 2006b).

Sin embargo, el rango fisiológico del hematocrito en dromedarios es muy amplio, con límites inferiores en torno a 15% y 16%, perteneciendo el último valor a dromedarios de carrera (Tornquist, 2010). En camellos con unos valores medios del hematocrito pre-infestación del 26%, tras la infestación se observó una disminución de hasta el 10% durante la primera semana, con valores medios de 15% en la cuarta semana (Ouma *et al.*, 1997). La anemia en camellos se ha clasificado como macrocítica, hipocrómica (Enwezor y Sackey, 2005) y hemolítica (Wernery y Kaden, 2002).

De acuerdo a Enwezor y Sackey (2005), la anemia en la fase temprana de la infestación en camélidos es hemolítica y hemofagocítica. No obstante, en camellos parasitados por *T. evansi* en Canarias la anemia observada fue clasificada como normocítica, de acuerdo a los valores del volumen corpuscular medio (VCM). En las fases finales de la misma la anemia se observó macrocítica y se atribuyó a un aumento de eritrocitos inmaduros circulantes en sangre periférica, lo cual confirmaba la naturaleza regenerativa de la anemia hemolítica. La hemoglobina medida fue significativamente inferior en los dromedarios con surra, con respecto al grupo control, pero dentro de los límites considerados fisiológicos para esta especie (Juste, 2000).

#### **5.2.1.1.2. Equinos**

El carácter regenerativo o no regenerativo de las anemias en caballos es difícil de interpretar, ya que en esta especie la policromasia no es un buen marcador del carácter regenerativo de las anemias. Los reticulocitos equinos maduran en la médula ósea, incluso cuando la eritropoyesis está aumentada, siendo raramente detectados en sangre periférica (Grondin y Dewitt, 2010). Sin embargo, en caballos que padecían enfermedad producida por *T. evansi* se observó policromasia, y además otras anomalías eritrocitarias como aparición de microesferocitos, acantocitos, dacrocitos, microcitos, eritrocitos vacuolados, algunos eritrocitos con formas extrañas e incluso adhesión de eritrocitos a tripanosomas y eritrofagocitosis (Silva *et al.*, 1995).

En caballos infestados por *T. evansi* existen descripciones de anemias normocíticas y normocrómicas (Rodrigues *et al.*, 2005, 2009; Berlin *et al.*, 2009), así como microcíticas y normocrómicas (Silva *et al.*, 1995).

En un grupo de caballos infestados con *T. evansi* de forma experimental, se observó a las tres semanas de la infestación una disminución en torno al 35% en el recuento de células rojas, hematocrito y concentración de hemoglobina, con pequeñas variaciones posteriores, manteniéndose la anemia hasta el final del periodo de observación, que fue de casi tres meses (Marques *et al.*, 2000).

#### **5.2.1.1.3. Carnívoros domésticos**

De forma semejante a lo descrito en caballos, en perros infestados con *T. evansi* de forma experimental se observaron valores disminuidos del recuento de eritrocitos, concentración de hemoglobina y hematocrito a partir de la tercera semana. Estos valores se situaron por debajo de los rangos de referencia fisiológicos y se mantuvieron estables hasta el final del periodo experimental (Aquino *et al.*, 2002). Los tipos de anemia descritos en el perro en infestaciones naturales han sido microcítica e hipocrómica (Silva *et al.*, 1995) y normocítica y normocrómica, probablemente como respuesta a una infestación crónica (Franciscato *et al.*, 2007). En perros inoculados con *T. evansi* se observó una anemia de tipo macrocítico y normocrómico (Aquino *et al.*, 2002).

En perros infestados por *T. evansi* se observaron algunas anormalidades eritrocitarias como policromasia, poiquilocitosis, microcitos y en ocasiones aparecieron eritrocitos con siluetas extrañas (Silva *et al.*, 1995).

En gatos inoculados con *T. evansi* de forma experimental, se observó como cambio hematológico más significativo la disminución en el recuento de eritrocitos, hematocrito y hemoglobina, denotando una anemia que fue de tipo normocítico y normocrómico, y se apreció carácter regenerativo por un aumento en el número de reticulocitos después del día 21 post-inoculación y observación de incremento de la policromasia, anisocitosis y metarubricitos a los 35 días post-inoculación (da Silva *et al.*, 2009b).

#### **5.2.1.1.4. Especies rumiantes ganaderas**

En la mayoría de unos terneros de raza frisona infestados de forma experimental con *T. evansi* se produjo una rápida caída del valor del hematocrito después de la aparición de los parásitos, y permaneció hasta el final del periodo de observación en valores inferiores a los obtenidos previamente a la inoculación (Payne *et al.*, 1992).

En terneros de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) infestados por *T. evansi* se observó disminución en la concentración de hemoglobina, hematocrito y recuento de eritrocitos, observándose unos valores aumentados del volumen corpuscular medio (VCM) y disminución de concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), describiéndose por tanto una anemia macrocítica e hipocrómica (Hilali *et al.*, 2006).

En cabras inoculadas experimentalmente se observó anemia normocítica y normocrómica, con carácter no regenerativo por disminución de la hematopoyesis en la fase tardía de la enfermedad, sobre todo en cabras que recibieron mayor dosis infestante (Dargantes *et al.*, 2005a). Sin embargo, en cabras infestadas experimentalmente con la cepa de *T. evansi* presente en Canarias, se observó recuperación de los valores del hematocrito a los 8 meses post-inoculación (Gutiérrez *et al.*, 2004a) dentro de rangos normales para esta especie (Byers y Kramer, 2010), aun habiendo recibido una dosis infestante aún mayor a la descrita por Dargantes *et al.* (2005a). En ovejas infestadas por *T. evansi* se observó una leve anemia caracterizada por una disminución en el recuento de eritrocitos y del hematocrito, citándose dos casos de autocuración donde se observó un incremento de estos parámetros que precedieron a la cura (Onah *et al.*, 1996).

#### **5.2.1.2. Hematología: Alteraciones de la serie blanca**

Las alteraciones en la serie blanca como consecuencia de la surra pueden ser enormemente variadas entre especies, e incluso dentro de la misma especie. Dentro de los leucocitos, generalmente son los linfocitos las células que presentan más variaciones en su recuento.

#### **5.2.1.2.1. Camélidos**

Se asocia un incremento de linfocitos, eosinófilos y monocitos a la infestación por *T. evansi* en camellos (Wernery y Kaden, 2002). En camellos parasitémicos se observó una leucocitosis de tipo linfocítica y monocítica, aunque también se registró un aumento de eosinófilos sin significación estadística (Juste, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005).

#### **5.2.1.2.2. Equinos**

Marques *et al.* (2000) describieron una infestación natural en caballos sin cambios significativos en la serie blanca, aunque algunos animales mostraron leucocitosis en algunos momentos durante el proceso. Silva *et al.* (1995) sin embargo, observaron una leve leucopenia con relativa linfocitosis y monocitosis, y disminución en el recuento de neutrófilos como alteraciones leucocitarias en caballos afectados también de forma natural. Por otro lado, Rodrigues *et al.* (2005) observaron leucocitosis, atribuida a linfocitosis, en la mitad de un grupo de caballos afectados de forma experimental por *T. evansi*. En una yegua infestada por *T. evansi* se observó una leucocitosis asociada a una marcada linfocitosis, y además un elevado número de células en el examen del líquido cefalorraquídeo, predominando los linfocitos y células plasmáticas (Berlin *et al.*, 2009).

#### **5.2.1.2.3. Carnívoros domésticos**

En un perro infestado de forma natural por *T. evansi* se observó leucopenia debido a linfopenia y eosinopenia en el momento de la valoración veterinaria tras historia de pérdida de peso desde hacía aproximadamente un año, debilidad, progresiva pérdida de apetito y anemia; un segundo hemograma realizado posteriormente aunque no se precisa cuanto tiempo después, reveló neutropenia y linfocitosis, con el recuento total de glóbulos blancos dentro de los límites fisiológicos (Franciscato *et al.*, 2007).

En perros infestados experimentalmente se manifestó leucopenia como consecuencia de una significativa neutropenia entre la semana dos y cinco post-infestación, restableciéndose los valores dentro de los rangos fisiológicos una vez pasado ese

periodo y hasta el final del estudio, si bien los valores fueron inferiores a los del grupo control. Además, y aunque los linfocitos presentaron una tendencia a la baja también entre la semana dos y cinco en los perros infestados, el recuento de estas células se mantuvo dentro de los límites fisiológicos (Aquino *et al.*, 2002).

#### **5.2.1.2.4. Especies rumiantes ganaderas**

En cabras inoculadas experimentalmente con *T. evansi* se observó un progresivo aumento en el recuento de leucocitos, los cuales se mantuvieron en valores altos durante seis/siete semanas, evolucionando a una leucopenia en la etapa tardía de la enfermedad. Esta evolución fue atribuida a la inmunosupresión y a su correlación directa con la dosis infestante (Dargantes *et al.*, 2005a).

En ovejas infestadas por *T. evansi* se observó una disminución transitoria en el conteo de leucocitos, seguido por un incremento significativo el día 22 tras la inoculación, observándose en paralelo un aumento constante de la proporción media y número de linfocitos y neutrófilos. Tras la infestación se observó una disminución de eosinófilos por debajo de los niveles previos a la inoculación que se mantuvo durante todo el curso de la infestación. Los monocitos mostraron inicialmente un incremento, pero sobre el día 12 post-inoculación se observó un retorno a los niveles previos a la inoculación (Onah *et al.*, 1996).

En ovejas que presentaron autocuración, se observó al inicio de la infestación una disminución mayor de leucocitos en los quince primeros días, pero después el recuento permaneció ligeramente por debajo de los niveles previos a la inoculación hasta el día 43, cuando retornó a los niveles anteriores. Independientemente de esto, hubo un patrón trifásico de linfocitosis, que fue paralelo con fases de neutropenia. La proporción media de eosinófilos disminuyó y permaneció en niveles previos a la inoculación, incluso después de la autocuración. La proporción media de monocitos mostró una disminución inicial y de forma general permaneció por debajo de los valores previos a la infestación, excepto en el día 43 (Onah *et al.*, 1996).

En terneros de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) infestados por *T. evansi* se observó incremento en el recuento de leucocitos con linfocitosis y monocitosis, no detectándose variaciones significativas en el recuento de neutrófilos y eosinófilos (Hilali *et al.*, 2006).

### **5.2.2. Alteraciones bioquímicas**

La infestación por *T. evansi* produce algunas alteraciones bioquímicas sanguíneas como consecuencia de alteraciones orgánicas derivadas de la patogenicidad del protozoo.

A continuación se presenta una revisión sobre las alteraciones en los distintos parámetros bioquímicos de mayor interés en las distintas especies animales.

#### **5.2.2.1. Proteínas séricas totales: Albúmina y globulinas**

En camellos infestados de forma natural por *T. evansi* se observó un aumento significativo de las proteínas totales, con un ratio A/G (albúmina/globulinas) disminuido con respecto a animales no infestados (Juste, 2000). En cabras infestadas experimentalmente con *T. evansi* se observaron fluctuaciones en la concentración de proteínas totales a lo largo del estudio, con aumentos significativos después de la inoculación (Gutiérrez *et al.*, 2004a).

De forma similar en perros y gatos inoculados de forma experimental con *T. evansi* se observó que los niveles de proteínas totales también aumentaron significativamente con respecto al grupo control, detectándose un aumento significativo de las globulinas y una disminución también significativa en la concentración de albúmina (Aquino *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2010).

En contraste con lo anterior, en caballos infestados de forma experimental no se detectaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de proteínas totales (Marques *et al.*, 2000). De forma semejante, en una yegua infestada de forma natural se observó hipoproteinemia; sin embargo y como en otras especies animales, se describió

hipoalbuminemia como hallazgo bioquímico (Berlin *et al.*, 2009). En esta especie también se ha descrito hiperproteinemia de grado variable (Rodrigues *et al.*, 2005).

Franciscato *et al.* (2007) describieron en un perro infestado de forma natural niveles normales de  $\alpha$ -globulinas y un aumento de  $\beta$ -globulinas e hipergammaglobulinemia con características de gammapatía policlonal. En gatos infestados se observaron incrementos en la fracción  $\alpha$ -2 globulina,  $\beta$ -globulinas (aunque dentro del rango fisiológico) y de  $\gamma$ -globulinas (Costa *et al.*, 2010). En camellos infestados por *T. evansi* el incremento de proteínas se debió a un aumento de las globulinas, fundamentalmente debido a  $\gamma$ -globulinas (Juste, 2000).

#### 5.2.2.2. Enzimas

De acuerdo a Enwenzor y Sackey (2005), en la patogenia de la infestación por *T. evansi* en camellos ocurren dos sucesos relacionados con las enzimas séricas:

1. en primer lugar aparece un marcado incremento de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) coincidente con la aparición de tripanosomas en el torrente sanguíneo. Se desconocen los mecanismos bioquímicos de este incremento.
2. en segundo lugar y también en el tiempo ocurre un marcado incremento de aspartato aminotransferasa (AST) y aumento moderado de alanina aminotransferasa (ALT).

En algunos estudios de la enfermedad natural en dromedarios no se detectaron alteraciones significativas de las enzimas amilasa, ALT, AST, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y lipasa, por lo que no se sugirieron alteraciones hepáticas (Juste, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005). En estos camellos se observaron incrementos significativos de creatin-cinasa, directamente relacionados con lesión muscular progresiva por caquexia y decúbito en las fases finales de la enfermedad (Juste, 2000).

En gatos infestados de forma experimental, los parámetros hepáticos no se encontraban alterados, ya que los valores de ALT y GGT no presentaron diferencia entre infestados y grupo control (da Silva *et al.*, 2009c). En perros infestados de forma experimental se observó un marcado incremento en los niveles de AST por encima de los valores normales, así como un moderado incremento de ALT pero dentro de los límites de referencia, de forma que se atribuyó el conjunto de estas alteraciones a daño cardíaco y no a daño hepático (Aquino *et al.*, 2002).

#### **5.2.2.3. Bilirrubina, índice icterico**

En dromedarios que presentaban parasitemia por *T. evansi* se encontraron valores de bilirrubina significativamente elevados, lo que se atribuyó a fenómenos hemolíticos (Juste, 2000). Sin embargo, en perros también infestados pero experimentalmente, la bilirrubina se mantuvo dentro del rango normal (Aquino *et al.*, 2002). En caballos se observó que los incrementos en el índice icterico coincidían con periodos de alta parasitemia, lo que sugiere que la ictericia aparece como consecuencia de una acción hemolítica de los parásitos (Marques *et al.*, 2000).

#### **5.2.2.4. Urea y Creatinina**

En un estudio con gatos experimentalmente infestados, los valores de urea y creatinina no presentaron diferencias comparados con el grupo control (da Silva *et al.*, 2009c). En dromedarios infestados naturalmente se observó daño renal, por aumento de creatinina y urea en animales parasitémicos (Juste, 2000), mientras que en otros casos, sólo se observó un aumento de la urea en sangre que no estuvo acompañado de elevación de creatinina y fue atribuido, por tanto, a un incremento en el catabolismo de las proteínas corporales (Gutiérrez *et al.*, 2005).

#### **5.2.2.5. Macro y microminerales**

Con respecto a los macro y microminerales, se ha observado hipercalcemia en una yegua infestada por *T. evansi* como hallazgo bioquímico anormal (Berlin *et al.*, 2009). En camellos afectados no se observaron alteraciones en los niveles de calcio, fósforo, sodio, potasio y cloro. Se observó disminución en la concentración de hierro con respecto a los no infestados (Juste, 2000; Gutiérrez *et al.*, 2005), lo que podría deberse a una disminución de proteínas transportadoras de hierro (Gutiérrez *et al.*, 2006b). En gatos infestados por *T. evansi* se observaron niveles disminuidos de hierro y de zinc, y aumentos en el nivel de cobre, no estando directamente relacionadas estas alteraciones con los picos de parasitemia (da Silva *et al.*, 2009c).

#### **5.2.2.6. Glucosa**

Se observan disminuciones significativas en la glucemia en dromedarios infestados respecto a los no infestados (Gutiérrez *et al.*, 2005). En un estudio experimental en caninos, los niveles de glucemia fluctuaron pero se mantuvieron dentro de los rangos normales y no se mostró ninguna tendencia particular entre infestados y grupo control (Aquino *et al.*, 2002). El primer camello diagnosticado en Canarias por *T. evansi* presentó una hipoglucemia extrema (Gutiérrez *et al.*, 1998).

#### **5.2.2.7. Parámetros lipídicos**

Los valores de colesterol y triglicéridos no mostraban variaciones entre dromedarios parasitémicos y controles (Juste, 2000).

### 5.3. Anatomía patológica

#### 5.3.1. Hallazgos macroscópicos

En las tripanosomosis se ha descrito una lesión dérmica denominada chancro caracterizada por un endurecimiento nodular, presentándose esta lesión como una zona de induración con abultamiento, con vesiculación central, descamación dérmica en los bordes e hiperpigmentación, todo ello acompañado de edema (Navarrete y Acosta, 1999).

En la necropsia de cabras afectadas por *T. evansi* se observaron cadáveres pálidos y anémicos, linfadenomegalia y presencia de líquido serohemorrágico en cavidades torácica y peritoneal (Dargantes *et al.*, 2005b), coincidiendo estos hallazgos con los observados en camellos enfermos de forma crónica, en los cuales además se han descrito petequias de forma difusa en las meninges del cerebelo y tronco cerebral (Wernery y Kaden, 2002).

En caprinos infestados se observó un corazón de aspecto pálido y flácido con derrame pericárdico serohemorrágico (Dargantes *et al.*, 2005b); en algunos ovinos se apreciaron hemorragias petequiales en mucosa abomasal, enteritis catarral y aumento en el tamaño de las glándulas adrenales (Audu *et al.*, 1999b). En ambas especies de pequeños rumiantes hubo hallazgos post-mortem coincidentes como esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenomegalia, describiéndose en ovinos congestión e inflamación del parénquima pulmonar, y en caprinos lóbulos pulmonares craneales más oscuros y firmes de lo normal (Audu *et al.*, 1999b; Dargantes *et al.*, 2005b).

En camellos afectados de forma aguda y subaguda se observan petequias en membranas serosas y en parénquima hepático y renal, apareciendo en casos subagudos hemorragias severas en la cauda equina (Wernery y Kaden, 2002).

En caballos se ha descrito esplenomegalia, linfadenomegalia e hiperplasia de folículos linfoides en bazo y ganglios linfáticos (Rodrigues *et al.*, 2005, 2009), coincidiendo estos hallazgos de necropsia con los encontrados también en algunas otras especies. Se han descrito además otras lesiones como edema subcutáneo, atrofia serosa de ganglios

linfáticos periféricos, inflamación renal con presencia de múltiples focos miliares rojos en la corteza, fluido claro en cavidad torácica y pericárdica, e hipertrofia de ventrículo izquierdo con atrofia serosa de la grasa pericárdica (Berlin *et al.*, 2009).

En équidos también se ha observado una atrofia muscular bastante marcada en los cuartos traseros (Rodrigues *et al.*, 2005, 2009). En gatos infestados experimentalmente se describió una evidente pérdida del volumen muscular en los miembros pelvianos, y además se encontró un grado variable de ictericia en tejido subcutáneo, serosas e íntima de las arterias, junto a mucosas pálidas, esplenomegalia, linfadenomegalia, y en algunos casos, edema subcutáneo en cabeza y párpados, opacidad corneal y ascitis (da Silva *et al.*, 2010b).

En un caballo afectado de forma subaguda se observó edema cerebral, con fibrina recubriendo las meninges también edematosas, y presencia de petequias en el aspecto ventral del tronco cerebral (Berlin *et al.*, 2009). En el cerebro de caballos infestados de forma crónica por *T. evansi* también se observó en algunos casos a nivel meníngeo hemorragias subpiales, apareciendo además en esta especie una inflamación asimétrica de los hemisferios cerebrales, con aplanamiento de las circunvoluciones. La sustancia blanca de los lóbulos parietal, temporal y frontal presentaba de forma zonal una coloración amarillenta y consistencia gelatinosa y friable a causa de un severo edema y malacia, presentándose en otro caso lesiones similares en el núcleo basal, tálamo y mesencéfalo (Rodríguez *et al.*, 2009).

En cadáveres de perros afectados por la enfermedad se observaron hallazgos característicos y comunes con otras especies, como emaciación, palidez de mucosas, linfadenomegalia edematosa y esplenomegalia, mostrando en un corte del bazo una prominente evidencia del tejido linfoide. Además algunos animales presentaron corazones con áreas pálidas en ambos aurículas y ventrículos derechos, mostrando estos últimos áreas hemorrágicas, y en un caso se apreció acumulación de líquido seroso en saco pericárdico (Aquino *et al.*, 2002).

### **5.3.2. Hallazgos microscópicos**

#### **5.3.2.1. Piel**

A nivel de la piel se ha observado en caprinos afectados una reacción leve de linfocitos y macrófagos, y edema en la dermis que se extiende a nivel subcutáneo. En éstas lesiones pudieron observarse tripanosomas (Dargantes *et al.*, 2005b).

#### **5.3.2.2. Sistema nervioso**

En caprino la actividad de los tripanosomas y la reacción celular en el sistema nervioso central fue principalmente a nivel meníngeo, y de tipo leve comparada con otras especies (Dargantes *et al.*, 2005b). En camellos las lesiones histológicas a nivel del sistema nervioso tienen un mayor carácter patognomónico, describiéndose meningitis no supurativas y meningoencefalitis focales de carácter leve a moderado en la mayoría de los animales afectados de forma aguda y subaguda (Wernery y Kaden, 2002). Se describen una infiltración perivascular amplia de leucocitos en la sustancia gris, presencia de “estructuras corpusculares” PAS positivas y eosinofílicas en las meninges e infiltrados en cauda equina, las cuales corresponden a células plasmáticas que contienen “cuerpos de Russel o Mott”. Estos hallazgos son también característicos en la tripanosomosis humana africana y otras encefalitis, habiendo sido descritas también estas estructuras en caballos como “células morulares” (Wernery y Kaden, 2002). Rodrigues *et al.* (2005) describieron en caballos lesiones histológicas tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris, mientras que Silva *et al.* (2010b), no observaron alteraciones microscópicas en el cerebro y médula espinal de gatos experimentalmente infestados con *T. evansi*.

En dos perros se observaron lesiones histológicas en el sistema nervioso que correspondieron a una meningoencefalitis no supurativa, con un marcado patrón infiltrativo de carácter mononuclear a nivel de sustancia blanca y gris de la corteza y pedúnculo cerebral, alrededor de vasos sanguíneos y en las meninges de la corteza cerebral, especialmente en el surco y alrededor de las vesículas meníngeas; además

aparecieron algunas lesiones que mostraron aspecto de nódulos gliales (Aquino *et al.*, 2002).

#### **5.3.2.3. Ojo**

En gatos con opacidad corneal se ha observado un engrosamiento de la córnea debido a edema estromal y discreta vascularización, con abundante fibrina en cámara anterior del ojo e infiltración de neutrófilos, linfocitos y células plasmáticas tanto en cámara anterior como en iris, cuerpo ciliar, limbo y conjuntiva, siendo probablemente responsables de estos cambios los tripomastigotes observados en el humor acuoso (Silva *et al.*, 2010b).

#### **5.3.2.4. Bazo y ganglios linfáticos**

En el bazo y ganglios linfáticos de cabras afectadas, se ha observado al principio de la enfermedad una fuerte reacción de linfocitos B y T simultáneamente a la respuesta de macrófagos, apareciendo de esta forma como característica temprana de la infestación una hiperplasia folicular y parafolicular activa y una congestión variable (Dargantes *et al.*, 2005b). En ovejas se ha descrito en el bazo una densa proliferación de linfocitos en los centros germinales que se extendió a la pulpa roja, y presencia de hemosiderosis y macrófagos con hemosiderina, con hallazgos similares en ganglios linfáticos (Audu *et al.*, 1999b). En gatos se ha observado igualmente en bazo y ganglios linfáticos una hiperplasia pero a nivel folicular, con presencia de gran cantidad de macrófagos en los senos de ambos órganos, probablemente debido a una prolongada estimulación antigénica (Silva *et al.*, 2010b). En perros se ha descrito esplenomegalia de diferentes grados, hemorragias dispersas y eritrofagocitosis, y en ganglios linfáticos también se observó hiperplasia linfoide con presencia de células mitóticas, proliferación de histiocitos, plasmocitos en cordones medulares y una marcada dilatación sinusal con presencia de edema (Aquino *et al.*, 2002).

En las fases avanzadas de la enfermedad en caprino y atribuido a una inmunosupresión, se describió en bazo y ganglios linfáticos una reducción de células en los centros

germinales, con degeneración celular, pocos linfoblastos, sin presencia de macrófagos de cuerpo tingible y disminución del manto de linfocitos. Sin embargo, especialmente en el bazo, tanto en las fases iniciales como finales se observaron depósitos de hemosiderina (Dargantes *et al.*, 2005b).

#### **5.3.2.5. Médula ósea**

En la médula ósea de cabras afectadas se ha observado en las etapas iniciales de la infestación una activa leucopoyesis y eritropoyesis y numerosos megacariocitos, seguidas por fenómenos de regresión (Dargantes *et al.*, 2005b). Sin embargo en un équido se observó hiperplasia eritroide, siendo los precursores de los eritrocitos las células más abundantes (Berlin *et al.*, 2009).

En cabras se ha descrito en algunos casos una ligera hemosiderosis e hiperplasia de folículos linfoides (Dargantes *et al.*, 2005b).

#### **5.3.2.6. Musculatura esquelética y cardíaca**

En musculatura esquelética y cardíaca de caprinos se han descrito infiltrados intersticiales y algunos daños en las fibras musculares, observándose tripanosomas en las áreas edematosas (Dargantes *et al.*, 2005b).

En algunos perros se ha observado una infiltración con predominio de células mononucleares en el miocardio de la aurícula y ventrículo derecho, así como degeneración de fibras cardíacas (Aquino *et al.*, 2002). Sin embargo, en ovinos no se apreciaron cambios histopatológicos significativos en corazón (Audu *et al.*, 1999b).

#### **5.3.2.7. Pulmón**

En las regiones apical y cardíaca del pulmón se han observado paredes alveolares delgadas debido a congestión y edema en intersticio, neumocitos inflamados e intensa

infiltración de linfocitos y macrófagos, con presencia en estas últimas células de depósitos de hemosiderina en algunos casos. Se ha detectado la presencia de tripanosomas a nivel pulmonar. Algunos alvéolos sufrían colapso; sin embargo, no había exudado en el interior de los alvéolos. Alrededor de los bronquios y bronquiolos se observaba edema, una reacción variable de linfocitos y células plasmáticas y hemosiderosis (Dargantes *et al.*, 2005b). En algunos pulmones de ovinos se ha descrito la presencia de congestión, enfisema, infiltración difusa mononuclear y edema pulmonar (Audu *et al.*, 1999b).

#### **5.3.2.8. Hígado**

En hígados de caprinos se ha observado infiltrado linfocítico principalmente en la distribución de la vena porta, con aparición en un caso de fibrosis portal. También se ha descrito una inflamación severa a nivel de las células de Kupffer, a menudo con hemosiderina, que aumentó con el tiempo, así como ligera degeneración grasa en los hepatocitos. Se observaba también edema de los espacios de Disse, dilatación sinusoidal, congestión venosa y evidencia de monocitosis en la sangre. En la sangre presente en el hígado se observaron numerosos tripanosomas, pero sólo unos pocos fueron detectados en las áreas edematosas. Se observó en algunos casos una hiperplasia focal en los conductos biliares, que podría suponer obstrucción al flujo de la bilis (Dargantes *et al.*, 2005b). En ovejas se ha visto necrosis centrolobulillar y otras áreas de necrosis, apareciendo en algunos casos eritrofagia, hemosiderosis y macrófagos con hemosiderina (Audu *et al.*, 1999b). En perros se ha observado degeneración grasa centrolobulillar en distintos grados y acumulación periportal de células mononucleares (Aquino *et al.*, 2002).

#### **5.3.2.9. Riñón**

Las lesiones renales en caprinos se centraban a nivel glomerular, con una inflamación de células mesangiales, epiteliales y endoteliales, así como un incremento de celularidad, principalmente linfocítica, además de congestión y edema y también reducción del espacio de Bowman. Se observaban tripanosomas en pequeño número y

condensación eosinofílica en el mesangio glomerular, que se ha atribuido a depósito de inmunocomplejos. El epitelio de los túbulos contorneados presentaba inflamación y aspecto granular (Dargantes *et al.*, 2005b).

Se han descrito lesiones histológicas similares en caballos, que incluyen engrosamiento de la membrana basal, sinequia glomerular y esclerosis, con una clasificación de glomerulonefritis membranoproliferativa. Sin embargo el protozoo no se detectaba ni directa ni indirectamente con el uso de métodos moleculares, por lo que las lesiones se han atribuido a un fenómeno inmunomediado. Se ha observado también degeneración de algunos de los túbulos renales, acompañada por infiltración de linfocitos y células plasmáticas (Berlin *et al.*, 2009). En ovejas se ha observado glomerulonefritis no supurativa, con infiltración de mononucleares y congestión en túbulos proximales y distales y en un caso se manifestaba necrosis no supurativa de túbulos renales (Audu *et al.*, 1999b).

En algunos casos de enfermedad final en caprinos se ha observado disminución de la celularidad en riñón, posiblemente asociado a inmunodepresión (Dargantes *et al.*, 2005b).

#### **5.3.2.10. Glándulas adrenales**

A nivel de las glándulas adrenales en caprinos infestados experimentalmente, se ha observado al mes post-infestación una infiltración linfocítica focal ligera a nivel medular con degeneración celular (Dargantes *et al.*, 2005b).

#### **5.3.2.11. Intestino**

En la especie caprina se ha descrito a nivel de intestino delgado y grueso una infiltración difusa de linfocitos de leve a severa, con presencia de macrófagos en la lámina propia, una reacción folicular del tejido linfático asociado a mucosas y, finalmente, algunos tripanosomas en mucosa y submucosa (Dargantes *et al.*, 2005b). En

ovejas no se han detectado hallazgos histopatológicos significativos en intestino (Audu *et al.*, 1999b).

#### **5.3.2.12. Aparato reproductivo**

En machos caprinos se han observado lesiones a nivel testicular de carácter leve en las primeras fases de la enfermedad, consistentes en edema intersticial y poca reacción celular. No obstante, con la evolución de la enfermedad se observaba una reacción linfoide variable y de macrófagos, a nivel intersticial. Algunos tripanosomas pudieron ser detectados en las áreas edematosas. La espermatogénesis, que presentaba una disminución en las etapas iniciales de la enfermedad, evolucionaba hacia una ausencia de espermatozoides y degeneración difusa de espermatogonias y células de Sertoli, produciéndose, como consecuencia, una reducción la fertilidad (Dargantes *et al.*, 2005b). En ovinos no se han detectado lesiones histopatológicas significativas en testículos, epidídimos y ovarios (Audu *et al.*, 1999b).

### **5.4. Patogénesis**

#### **5.4.1. Generalidades**

*T. evansi* es un parásito patógeno para la mayoría de mamíferos domésticos, pero sus efectos en los diferentes hospedadores varían de acuerdo a la virulencia de la cepa, el nivel de susceptibilidad del hospedador y las condiciones epizootológicas locales (Hoare, 1972). Por tanto y de una forma generalizada, podrían incidir sobre la gravedad del cuadro clínico, además de la virulencia de la cepa, factores como primoinfestaciones o reinfestaciones y la dosis infestante. Asimismo, en cuanto al grado de susceptibilidad del hospedador, además de la propia especie hospedadora en sí, podrían influir otros factores individuales como el estado inmunitario, la edad, estado nutricional y otras enfermedades concomitantes. Por último, en lo que respecta a las condiciones epizootológicas o epidemiológicas, podrían influir la duración del contacto hospedador-parásito, el mayor o menor grado de desarrollo de vectores y el sistema de explotación animal (Navarrete y Acosta, 1999).

En la patogénesis de la surra, *T. evansi* se manifiesta en el hospedador mediante una acción tóxica, a través de sus productos de secreción y excreción, un efecto antigénico, y por último, una significativa acción mecánica a nivel capilar (Quiroz, 1986). Otra acción que lleva a cabo *T. evansi* es una actividad expoliadora de la glucosa del hospedador, lo cual puede producir una interferencia en el metabolismo de los carbohidratos y conducir a taquipnea e incluso asfixia debido a la acidosis metabólica por elevación del ácido láctico (Barman *et al.*, 2010).

Respecto a la patogenia de la enfermedad se pueden distinguir dos aspectos bien diferenciados; por un lado la evolución de la enfermedad especialmente a nivel hemático, originando una anemia marcada, y por otro lado la evolución a nivel extravascular, causando enfermedad inflamatoria y degenerativa con amplias zonas de necrosis (Navarrete y Acosta, 1999).

El sistema linfático se ve también invadido por los protozoos, convirtiéndose en una ruta importante en la diseminación de los mismos, constituyendo los nódulos linfáticos una localización secundaria para la proliferación de los tripanosomas, apuntándose incluso a una mayor predilección de *T. evansi* por tejidos y fluidos corporales que por la sangre (Onah *et al.*, 1998a).

A este respecto, las lesiones locales en los órganos parasitados son de naturaleza perivascular, con gran infiltrado de células plasmáticas y mononucleares y aparición de edema intersticial y hemorragias (Navarrete y Acosta, 1999), destacando *T. evansi* por su tropismo nervioso y muscular (Desquesnes, 2004).

#### **5.4.2. Formación inicial del chancro e implicación en la patogenia**

Tras la inoculación intradérmica, a tenor del número bajo de tripanosomas portados en las probóscide de los vectores, es posible que se produzca una fase temprana de multiplicación en la piel, que sirve para incrementar tanto la población de tripomastigotes inoculados, como la diversidad antigénica de los parásitos que acceden posteriormente al torrente sanguíneo. La multiplicación de los tripanosomas y a su vez

el resultado de una intensa infiltración de células polimorfonucleares, pueden promover la inducción de la inmunidad (Luckins y Dwinger, 2004).

Las formas tripomastigotes de *T. evansi* cuando son inoculadas intradérmicamente en los hospedadores mamíferos, inducen la formación de una lesión cutánea edematosa, conocida como chancro (Luckins y Dwinger, 2004). Este surge como resultado de la propia respuesta celular, haciendo su aparición las células mononucleares, lo que produce una vasodilatación que hace posible la penetración de los parásitos en el torrente circulatorio sanguíneo para su distribución por el organismo (Navarrete y Acosta, 1999).

#### **5.4.3. Parasitemia y fiebre intermitentes. Consecuencias**

Después de un periodo de incubación, los tripanosomas invaden la sangre y pueden aparecer de forma periódica o persistir a lo largo de la infestación, pero en ambos casos la parasitemia fluctúa con la temperatura del hospedador (Hoare, 1972). Asimismo, el grado de parasitemia paralela a la temperatura implica que el número de tripanosomas en la circulación, y posiblemente también en los tejidos, esté relacionado con la concentración de citoquinas pirógenas (Dargantes *et al.*, 2005a).

La merma de la condición corporal se ha asociado a la respuesta febril del organismo frente a *T. evansi*, más que a una disminución de la ingesta. Así, la fiebre podría contribuir a la pérdida de peso y emaciación (Aquino *et al.*, 1999) o a la disminución de la ganancia de peso observada en animales en crecimiento afectados por la enfermedad, debido a que se producen aumentos de alrededor del 15% en la tasa metabólica por cada grado centígrado de temperatura corporal que se incrementa (Payne *et al.*, 1992).

La desaparición de la oleada parasitémica se produce por una reacción con los anticuerpos específicos formados, dando lugar a la ruptura de los tripanosomas y consiguiente liberación de antígenos somáticos. La aparición de la fiebre en agujas (intervalos entre 2 y 10 días), paralela a la oleada parasitémica tiene su origen en la capacidad evolutiva de los tripanosomas de cambiar su composición antigénica

superficial, lo que les permite de nuevo y repetidamente llegar a sangre e iniciar el proceso (Navarrete y Acosta, 1999).

Se ha sugerido que la velocidad de producción de anticuerpos contra cada variación antigénica, la cual determina los intervalos entre sucesivos picos de parasitemia, está directamente relacionada con la cantidad de tripomastigotes que producen la infestación (Dargantes *et al.*, 2005a).

#### **5.4.4. Período de prepatencia**

Interpretando el período de prepatencia como la etapa de la infestación parasitaria comprendida desde el momento de la inoculación del parásito hasta la presencia de éste en sangre, debemos mencionar que la valoración de este intervalo guarda relación con la técnica diagnóstica empleada, así como con el número y virulencia de los tripanosomas inoculados (Holland *et al.*, 2001). Se muestran diferencias en el periodo de prepatencia entre diversos estudios en distintas e incluso las mismas especies y vías de contagio.

Así, se ha observado un periodo de prepatencia de 24-48 horas en gatos tras inoculación intravenosa, con un pico de parasitemia a los 5 días (da Silva *et al.*, 2010a); aplicando la misma vía de contagio, en caprinos y ovinos algunos autores han observado un periodo de prepatencia entre 2 y 6 días (Audu *et al.*, 1999a; Dargantes *et al.*, 2005a).

En conejos, el periodo de prepatencia observado a través de frotis sanguíneos en una infestación experimental intraperitoneal por *T. evansi* fue de 11 días (da Silva *et al.*, 2008b). No obstante, en otro estudio en conejos infestados también intraperitonealmente, los parásitos fueron detectados en sangre entre 15 y 18 días post inoculación, lo cual se comprobó a través de inoculación de la sangre en ratones, en los cuales se detectó a su vez a los 8 días post inoculación (Barman *et al.*, 2010).

Por otro lado, en una infestación experimental en ratones donde no se cita la vía de contagio, se pudo detectar *T. evansi* a las 12 horas mediante PCR, pero no es hasta las 24-72 horas cuando se puede detectar mediante métodos diagnósticos parasitológicos directos (Fernández *et al.*, 2009).

En perros se ha observado un periodo de prepatencia de alrededor de dos semanas, en infestación tanto por vía endovenosa como por vía oral (Raina *et al.*, 1985; Aquino *et al.*, 1999; Bazolli *et al.*, 2002); sin embargo, en roedores infestados por vía oral se mostraron diferencias, con periodos de prepatencia de entre dos y diez días en ratones (Raina *et al.*, 1985), y con una media de tres semanas en ratas (da Silva *et al.*, 2007). En cerdos inoculados de forma experimental se observó *T. evansi* en sangre desde la primera semana en adelante, sin observarse signos clínicos de la infestación (Holland *et al.*, 2003).

El periodo de incubación de *T. evansi* en camellos varía desde alrededor de 7 días en el norte de África a 2-3 semanas en Asia (Barotte, 1925 y Yakimoff 1931, citado por Hoare, 1972). En un dromedario inoculado de forma experimental con un stock de *T. evansi* de Mauritania, se observó un periodo de prepatencia de 6 días (Dia *et al.*, 1997d).

Según recoge Hoare (1972), Galuzo y Novinskaja (1960) inocularon en terneros cepas de *T. evansi* de equino y camello de Kazajistán y los mantuvieron durante 2 años. En este experimento describieron que la infestación persistió oculta en los bovinos durante 4 meses. Sin embargo, en una infestación experimental en terneros frisones, se observó un periodo de prepatencia de 48 horas, con niveles de parasitemia altos durante las primeras 4 ó 5 semanas tras la infestación, con una frecuencia de aparición de picos de parasitemia de 7 días, observándose una disminución de la probabilidad de detección del parásito con el paso del tiempo (Payne *et al.*, 1992).

En caballos inoculados de forma experimental con *T. evansi* por vía intravenosa, se constató un periodo de prepatencia de 4 días, en concordancia con observaciones anteriores citadas por otros autores en infestaciones naturales y experimentales (Marques *et al.*, 2000).

#### **5.4.5. Patogenia de la anemia. Consecuencias**

La patogénesis de la anemia en la tripanosomosis por *T. evansi* todavía no ha sido definida de forma clara, y se han propuesto varios mecanismos que podrían incluso estar combinados entre sí.

Así se ha sugerido que la acción mecánica ejercida por la motilidad de los parásitos podría provocar la rotura de los eritrocitos (da Silva *et al.*, 2010c). Por otro lado y de una forma general se han propuesto alteraciones hematopoyéticas como mecanismo productor de la anemia, y de una forma más concreta se ha relacionado con bajo nivel sérico de hierro y/o reducción de la actividad de la enzima acetilcolinesterasa en sangre, lo que produce alteraciones en la producción y maduración de los glóbulos rojos (da Silva *et al.*, 2009c; 2010c, d).

Otro de los mecanismos sugeridos como desencadenante de la anemia ha sido el estrés oxidativo, que produce alteraciones de la membrana eritrocítica aumentando su fragilidad. La parasitemia por *T. evansi* se ha relacionado no sólo con una mayor producción de radicales libres (óxido nítrico), aumento de la peroxidación lipídica e incremento de metahemoglobina, sino además también con una ineficiente capacidad de las barreras antioxidantes que tiene el organismo, que se manifiesta por la inhibición de la actividad antioxidante de la enzima superóxido dismutasa en eritrocitos y disminución sérica de glutatión, albúmina e ión ascorbato (vitamina C) (Saleh *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2009d, 2010c)

Por último, se ha mencionado como causa de anemia la destrucción de los hematíes por el sistema retículo-endotelial. A este respecto, por un lado se ha sugerido un mecanismo inmunomediado, con la participación de inmunoglobulinas específicas contra *T. evansi*, dando lugar a la formación de inmunocomplejos con el antígeno y el complemento sobre la superficie de los eritrocitos, permitiendo así el secuestro y destrucción de los hematíes por el sistema retículo-endotelial (Audu *et al.*, 1999a). Por otro lado se ha propuesto la implicación de la producción de neuraminidasa o sialidasa por parte de *T. evansi*, lo que puede causar daños a las células y las hace más propensas a la hemólisis por parte del sistema retículo-endotelial (Shehu *et al.*, 2006). Se ha demostrado que en animales infestados por *T. evansi* puede ocurrir eritrofagocitosis en el torrente sanguíneo (Silva *et al.*, 1995).

En relación con la destrucción de hematíes, en la infestación por *T. evansi* aparece un aumento del índice ictérico coincidente con periodos de alta parasitemia, relacionándose la ictericia con la acción hemolítica de los parásitos (Marques *et al.*, 2000).

La severa anemia y destrucción de eritrocitos por el sistema retículo-endotelial, puede explicar la respuesta inicial de la médula ósea en la cual se produce una activa leucopoyesis y eritropoyesis. Sin embargo, en las fases finales se puede producir una regresión de la actividad de la médula ósea por un origen inmunogénico, pero que podría ser en parte debida a la citotoxicidad de los propios tripanosomas (Dargantes *et al.*, 2005b).

Baral *et al.* (2007) describieron que la anemia no es el principal determinante en el tiempo de supervivencia del hospedador, y señalan que la anemia parece estar relacionada al factor de necrosis tumoral (TNF), a través de la señal mediada por TNF-R2 durante la última etapa de desarrollo de la misma.

La anemia persistente conduce a una disminución de la llegada de oxígeno a los tejidos, apareciendo en estas condiciones signos de disfunción en algunos órganos, lo que produce un aumento del gasto cardíaco y afecta sobre todo al sistema nervioso, con desarrollo de anoxia cerebral. Esto puede contribuir a producir depresión del estado mental en el animal afectado (Enwezor y Sackey, 2005).

#### **5.4.6. Patogenia del edema**

Otro de los fenómenos que se presenta en la tripanosomosis por *T. evansi* es el edema, debido al aumento de la permeabilidad endotelial de los vasos sanguíneos por las reacciones inflamatorias continuas, así como a la formación de inmunocomplejos que ocasionan un incremento en la liberación de cininas plasmáticas (Barman *et al.*, 2010).

Además, se ha sugerido que el edema puede ser atribuido a variaciones en la presión osmótica debidas a la reducción del nivel de proteínas, concretamente hipoalbuminemia como consecuencia del aumento de la permeabilidad vascular, y por lo tanto extravasación de albúmina al intersticio (Silva *et al.*, 2010e). Se ha sugerido además en rumiantes que la disminución de la concentración plasmática de proteínas puede ser debida a destrucción de proteínas o pérdida de urea y hemodilución (Audu *et al.*, 1999a).

De acuerdo a Costa *et al.* (2010), se han propuesto otros mecanismos para explicar la hipoalbuminemia observada en algunas especies. En primer lugar, puede ser debida a un mecanismo compensatorio para mantener la osmolaridad, teniendo en cuenta que la hipoalbuminemia es seguida por el desarrollo de hiperglobulinemia; otra de las posibles causas podría ser la insuficiencia hepática; y por último se ha propuesto la implicación de las citoquinas, concretamente la interleucina 1 (IL-1), que modula la producción de proteínas por los hepatocitos y disminuye la producción de albúmina y transferrina.

Otro mecanismo propuesto, que podría interpretar el edema observado en diferentes zonas corporales, se ha centrado en una rápida sucesión de variaciones antigénicas de los tripomastigotes, lo que conllevaría una estimulación no específica de la proliferación de células B, hecho que incrementaría el nivel de macroglobulinas. Estas macroglobulinas podrían incrementar a su vez la viscosidad plasmática, lo que conduciría a estasis vascular sanguínea, permitiendo a continuación que escape al espacio extravascular la porción plasmática de la sangre (Barman *et al.*, 2010).

#### **5.4.7. Invasión del sistema nervioso central y alteraciones neurológicas**

Como continuación de la etapa temprana hemolinfática en la tripanosomosis por *T. evansi*, seguidamente los tripomastigotes invaden el sistema nervioso central al traspasar la barrera hematoencefálica. El mecanismo por el cual los tripomastigotes traspasan esta barrera es desconocido, pero se cree que ocurre de forma primaria por una acción directa del parásito que interrumpe la continuidad de la estructura, o bien secundariamente por liberación de mediadores químicos incluyendo citoquinas y proteasas (Silva *et al.* 2011; Berlin *et al.*, 2009, Rodrigues *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la ruta por la cual se abren las uniones celulares (zonula ocludens) del epéndimo tiene lugar en los plexos coroideos, donde se forma el líquido cefalorraquídeo (Lemos *et al.*, 2008)

En el sistema nervioso central se produce una infiltración perivascular de linfocitos y células plasmáticas, causando una meningoencefalitis no supurativa con necrosis, edema, hemorragia, pleiocitosis con linfocitosis predominante, y además presencia de

tripomastigotes en el líquido cefalorraquídeo (Berlin *et al.*, 2009, Rodrigues *et al.*, 2009).

La sintomatología neurológica presente en la tripanosomosis por *T. evansi* ha sido relacionada por da Silva *et al.* (2010d, 2011) con alteraciones del neurotransmisor acetilcolina, mediante mecanismos hipotéticos distintos:

- Por un lado, en el sistema nervioso central se han descrito tanto disminuciones como incrementos en la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, y a su vez y respectivamente se sugirió una relación de la sintomatología neurológica por una disminuida o excesiva hidrólisis del neurotransmisor, teniendo en cuenta que esta enzima es la encargada de la catálisis de acetilcolina.
- Otra hipótesis en la que se ha relacionado a la disminución de acetilcolina en las estructuras cerebrales es la presencia de unos 1200 receptores nicotínicos de acetilcolina que presenta cada tripomastigote de *T. evansi*, pudiendo así reducir la cantidad de este neurotransmisor en el espacio sináptico.
- Por último, otra de las hipótesis sugeridas para explicar el aumento de la acetilcolinesterasa ha sido la presencia de esta enzima en el parásito, no asociándose entonces a una respuesta colinérgica en sí por parte del hospedador.

Además del papel de la colinesterasa, las alteraciones locomotoras como incoordinación o parálisis de miembros posteriores se han relacionado también con lesiones en nervios, más que como consecuencia de la atrofia muscular (Silva *et al.*, 2011).

#### **5.4.8. Respuesta inmunitaria. Inmunodepresión**

En la respuesta inmunitaria frente a *T. evansi* se observan dos factores asociados a los mecanismos de defensa a través de la respuesta de tipo celular, representada por la fagocitosis del parásito, y la respuesta de tipo humoral, representada por la tripanolisis (Quiroz, 1986).

Se ha sugerido que la citopatología mostrada en la enfermedad aparece como respuesta al sistema inmunitario (Dargantes *et al.*, 2005b). Como ejemplo y sin necesidad de una acción directa de los tripomastigotes sobre el riñón, se puede producir glomerulonefritis que puede responder a un proceso inmunomediado secundario a la infestación, por depósito de inmunocomplejos (Berlin *et al.*, 2009), incluso pudiendo estas lesiones del glomérulo contribuir a la muerte del animal (Dargantes *et al.*, 2005b).

#### **5.4.8.1. Respuesta inmunitaria celular**

Durante la infestación por *T. evansi* se produce una reacción celular generalizada esencialmente de linfocitos y macrófagos (presumiblemente con células dendríticas), tanto en el sistema linfático como en el resto de órganos. La respuesta inmunitaria frente a la infestación aparece intensamente a través de linfocitos B y T, dando como resultado deposición de hemosiderina en distintos órganos por la respuesta simultánea de los macrófagos (Dargantes *et al.*, 2005b).

De acuerdo a Onah *et al.* (1999), la composición de linfocitos en la sangre periférica de ovejas infestadas por *T. evansi* se ve alterada. En ese estudio se observó un comportamiento distinto en las subpoblaciones celulares de linfocitos en unas ovejas que curaron sin necesidad de tratamiento, frente a ovejas infestadas que no curaron hasta que se aplicó terapia, por lo que estos cambios se relacionaron con la habilidad para controlar la enfermedad. Los cambios celulares en los animales que remitieron sin quimioterapia tuvieron las siguientes características:

- Se produjo una disminución, por debajo de los niveles previos a la infestación, de la subpoblación CD8+ durante el curso de la infestación, mientras que la subpoblación CD4+ aumentó o se mantuvo la mayor parte del tiempo, con respecto a los niveles preinfestivos. Esto se observó como un ratio CD4:CD8 incrementado con respecto al grupo de ovejas que hubo que tratar en las cuales este ratio disminuyó.
- A pesar de que hubo un aumento en los linfocitos B circulantes en todos los animales infestados, este incremento fue significativamente más bajo en los

animales que remitieron sin terapia, presentando en éstos un comportamiento bifásico en el cual la segunda fase coincidió con incrementos de linfocitos T CD5<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, y a su vez con el periodo de control de los parásitos y de la curación.

También se ha observado la coexpresión de antígenos de superficie CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en linfocitos T, asociados a infestaciones por *T. evansi*, sin conocerse el fenómeno que lo produce. La posterior depleción observada en el número de todas las subpoblaciones de linfocitos, podría explicarse a través de apoptosis o muerte celular programada asociada a coexpresión de estos dos antígenos de superficie (Onah *et al.*, 1998a).

Conforme avanza la enfermedad se produce un agotamiento del sistema inmunológico que deriva en inmunosupresión por inducción de la liberación de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) por subpoblaciones de linfocitos T (Dargantes *et al.*, 2005b). Se ha sugerido la implicación de IFN $\gamma$ , dependiente de la producción de NO, en la supresión de esplenocitos en la tripanosomosis por *T. evansi* (Baral *et al.*, 2007).

Además, la inmunosupresión que se presenta en infestaciones por *T. evansi* produce una incapacidad de los animales hospedadores para responder adecuadamente a la presencia de antígenos heterólogos, pudiendo producir interferencias en el desarrollo de una protección efectiva frente a otras enfermedades distintas a la producida por *T. evansi* (Onah *et al.*, 1998b; Holland *et al.*, 2003).

Se ha observado que *T. evansi* induce en el hospedador un incremento de linfocitos B CD5<sup>+</sup>, es decir con antígeno de superficie CD5, y estas células representan a la mayoría de los linfocitos B circulantes durante el curso de la infestación (Onah *et al.*, 1998a, b). La molécula CD5, aunque originalmente se encuentra en linfocitos T, la expresan los linfocitos denominados como B1a, los cuales siguen un proceso de diferenciación distinto de los linfocitos convencionales; sólo son producidos durante la etapa fetal y se encargan de producir IgM, llamados anticuerpos “naturales” o de “baja afinidad”, con un papel importante frente a antígenos independientes de linfocitos T (Arjona Saz, 2007; Abbas y Litchman, 2003).

A nivel local, se ha demostrado por ejemplo en el sistema nervioso central el papel que desempeña la microglia para actuar como células presentadoras de antígeno, produciendo una amplificación local de la respuesta inmunológica por reestimulación de linfocitos T. También se evidenció que el número de células presentadoras de antígeno y el nivel de expresión de moléculas de histocompatibilidad clase II en las diferentes poblaciones del sistema nervioso central podrían influir en el resultado de la respuesta inmunológica (Lemos *et al.*, 2008).

#### **5.4.8.2. Respuesta inmunitaria humoral**

##### **5.4.8.2.1. Anticuerpos**

En lo relativo a la defensa humoral, el rol que se le ha atribuido a los anticuerpos en el control de la enfermedad es controvertido. Así, se ha atribuido un papel esencial a las IgM, en vez de a las IgG, las cuales contribuyen significativamente durante las etapas iniciales de la infestación al control de la parasitemia y supervivencia del hospedador, indicándose que los “anticuerpos de baja afinidad” son los principales responsables de la protección frente a *T. evansi* (Baral *et al.*, 2007). En oposición, observaciones realizadas por otros autores no relacionan el nivel de anticuerpos con la habilidad de los mismos para controlar la parasitemia (Payne *et al.*, 1992; Aquino *et al.*, 1999).

Onah *et al.* (1999) sugirieron que la habilidad para eliminar los parásitos depende de los anticuerpos aunque no de forma exclusiva, siendo importante para ello no sólo la IgM sino también la IgG1. Así, utilizando ovejas como modelo experimental, observaron en todos los animales infestados por *T. evansi* una respuesta específica de IgM e IgG1. No obstante, se observó que en un grupo que curó sin necesidad de tratamiento, los niveles de inmunoglobulinas IgM e IgG1 fueron superiores y paradójicamente presentaron menor proporción de linfocitos B que el grupo de animales tratados. Además esta respuesta se muestra inicialmente con niveles altos de IgM y a continuación es reemplazada por altos niveles de IgG1, no ocurriendo este reemplazo en los animales tratados hasta la aplicación del quimioterápico.

En la tripanosomosis se observa un aumento de susceptibilidad a infecciones o infestaciones secundarias debido a la inmunodepresión que se produce. Así, Sharma *et al.* (2000) por ejemplo, advirtieron una disminución en la resistencia frente a *Hameonchus contortus* en cabras, sugiriendo como causa la supresión de IgE por parte de *T. evansi*.

#### **5.4.8.2.2. Sistema del complemento**

El sistema del complemento es un sistema funcional integrado por unas 30 proteínas que interaccionan entre sí de modo regulado, dando lugar a una cascada enzimática la cual resulta ser un mecanismo efector muy importante en la respuesta inmunológica innata, así como en la respuesta inmunológica adaptativa (Cutuli de Simón, 2007). La proteína C3, que resulta escindida en los fragmentos 3Cb y 3Ca, por cualquiera de las vías de activación de este sistema, la convierte en la proteína central del sistema del complemento (Abbas y Litchman, 2003), de ahí su importancia en la respuesta inmunológica, ya que su depleción en la tripanosomosis por *T. evansi* puede determinar el curso de la infestación y la respuesta del animal a una segunda exposición al agente (Uche y Jones, 1993a)

Aunque la vía alternativa puede ser activada, la vía clásica parece ser la vía dominante en respuesta a la infestación por *T. evansi*, tanto en la fase temprana como tardía de la enfermedad (Uche y Jones, 1993b).

Tras la infestación por *T. evansi* se produce un ligero incremento en los niveles del complemento, seguido por una reducción y agotamiento de estos niveles, lo que se explica a través de la vía clásica, por la activación de C3 debido a los complejos antígeno-anticuerpo que se forman cuando los parásitos son destruidos por los mecanismos effectores. Esto demuestra una correlación negativa entre la parasitemia, que aumenta, y el sistema del complemento, que disminuye sus valores conforme avanza la infestación, lo cual apunta hacia la importancia que podría tener el sistema de complemento en la eliminación de los parásitos vivos. La disminución de los niveles del complemento produce inmunodepresión e incrementa la susceptibilidad a infecciones o infestaciones secundarias (Ouma *et al.*, 1997).

#### 5.4.9. Desórdenes hormonales

La importancia exacta de los trastornos hormonales en la patología de la tripanosomosis africana en general, y de la surra en particular, sigue siendo desconocida (Antoine-Moussiaux y Desmecht, 2008a).

Algunos trastornos reproductivos han sido asociados a la infestación con *T. evansi*, como el caso de los abortos en dromedarias (Gutiérrez *et al.*, 2005), así como alteraciones seminales cualitativas y cuantitativas en caprino, incluso produciendo aspermia en animales con orquitis clínica (Ngeranwa *et al.*, 1991). A este respecto, en camellos machos infestados con *T. evansi* se observaron también alteraciones en la calidad y cantidad del semen. Estos fenómenos fueron independientes de causas inmunomediadas y/o degeneración testicular y se relacionaron con un aumento significativo en la concentración plasmática de 17 $\beta$ -estradiol, así como de una disminución en la concentración de testosterona. Ello se podría explicar desde una disfunción de la glándula pituitaria, alterando así el eje hipotalámico-hipofisario-testicular (Al-Qarawi *et al.*, 2004).

Sin embargo y en contraste con el posible papel hormonal en la patogenia de esta enfermedad, no se ha observado asociación entre alteraciones del ciclo estral e infestación por *T. evansi* en novillas. En un único caso se observó interrupción del ciclo, que fue atribuido de forma indirecta a la enfermedad producida por el parásito debido a pérdida de condición corporal del animal (Payne *et al.*, 1993).

En caballos infestados con *T. evansi* de forma crónica se observaron bajos niveles de hormonas T3 y T4, que indicaban la presencia de hipotiroidismo subclínico, y además se producía alta concentración plasmática de cortisol, por lo que se sugirió un origen hipotalámico (Varshney *et al.*, 1999). En camellos infestados con *T. evansi* también se ha observado hipotiroidismo, evidenciado por una disminución de hormonas tiroideas T3 y T4, asociada a una reducción paralela de los niveles de la hormona tirotrópica (TSH) (Al-Qarawi *et al.*, 2001).

Las disfunciones endocrinas podrían ser debidas en parte al daño tisular observado a nivel glandular, aunque recientes avances incriminan a la producción de proteasas y

peptidasas por parte de los tripanosomas, las cuales actúan sobre las hormonas peptídicas en el torrente sanguíneo (Antoine-Moussiaux y Desmecht, 2008a). Así, en el caso de *T. evansi* se ha descrito la oligopeptidasa B (OpdB), que juega un rol importante en el desequilibrio hormonal, específicamente produciendo una depleción de los niveles plasmáticos del péptido natriurético atrial (PNA) en los mamíferos infestados por este protozoo (Morty *et al.*, 2005). Esto perturbaría, por tanto, la homeostasis del volumen sanguíneo, anulando las actividades vasodilatadores, diuréticas y natriuréticas del PNA (Antoine-Moussiaux y Desmecht, 2008a). Estos factores peptídicos podrían ser compartidos por diferentes *Trypanosoma* spp. africanos. Así, se ha descrito que *T. brucei* produce otra peptidasa que origina disminución en los niveles de las hormonas tiroideas, convirtiendo a las peptidasas en factores de virulencia actualmente considerados como objetivos quimio-terapéuticos e incluso vacunales (Antoine-Moussiaux y Desmecht, 2008a).

## **6. DIAGNÓSTICO DE LA TRIPANOSOMOSIS POR *Trypanosoma evansi***

El diagnóstico clínico de la tripanosomosis es difícil en hospedadores mamíferos teniendo en cuenta que los signos clínicos que se presentan son además comunes a otras hemoparasitosis, e incluso a otras enfermedades del ganado. A ello se le suma que *T. evansi* no es específico de especie hospedadora, por lo que se hacen necesarios procedimientos laboratoriales para confirmar las sospechas clínicas y también para estudios epidemiológicos (Desquesnes, 2004).

Para el diagnóstico de la surra existen muchos procedimientos de laboratorio y también de campo, los cuales están estandarizados de forma internacional en el “Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres” de la OIE, e incluyen métodos directos de identificación del agente causal, así como pruebas serológicas que detectan anticuerpos específicos o no específicos producidos como respuesta a la enfermedad (OIE, 2010).

A pesar de la existencia de numerosas técnicas de laboratorio, el diagnóstico de *T. evansi* sigue siendo dificultoso, observándose limitaciones importantes en aquellos métodos que se utilizan comúnmente. La selección del método diagnóstico para realizar un estudio epidemiológico debe tomar en consideración aspectos relativos a la sensibilidad, especificidad, tratamiento de las muestras, tiempo de ejecución y costes (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).

La detección de los tripanosomas puede realizarse sobre muestras de sangre, ganglios linfáticos, líquido cefalorraquídeo, secreciones genitales y frotis de órganos, pudiendo utilizarse estas muestras en forma fresca, fijada y/o congelada, dependiendo del test a realizar (Desquesnes, 2004).

Teniendo en cuenta que los métodos diagnósticos para *T. evansi* no siempre son capaces de revelar “*per se*” el número total de animales infestados, se recomienda como la mejor opción una combinación de dos o más técnicas para el diagnóstico de este parásito (Monzón *et al.*, 1990). De esta forma, Desquesnes *et al.* (2009b) sugirieron que varias técnicas tales como el enzaiminmunoensayo y técnica de aglutinación sobre

tarjeta deben ser sistemáticamente aplicadas juntas para detectar IgG e IgM, y los métodos parasitológicos y la PCR para detección sensible de infestaciones por *T. evansi*.

## **6.1. Métodos de identificación del agente**

### **6.1.1. Examen directo al microscopio**

El examen directo al microscopio consiste en la observación de los parásitos en una muestra fresca o fijada, siendo la sangre el material biológico que con mayor frecuencia se utiliza, debiendo ser examinada tan pronto como haya sido obtenida (Desquesnes, 2004).

Así, se recomienda que la sangre para el diagnóstico sea extraída de venas periféricas de los pabellones auriculares o de la vena caudal, aunque por motivos prácticos, la vena yugular se convierte frecuentemente en el punto de elección para la extracción. Sin embargo, menos de la mitad de los animales infestados pueden ser detectados por el examen de sangre. Otros tipos de muestras que se utilizan con asiduidad para el diagnóstico son las biopsias de los ganglios linfáticos preescapular o precrural, o el líquido edematoso (OIE, 2010).

Dentro de los métodos diagnósticos a través de examen directo al microscopio figuran la técnica de gota gruesa, tinción de frotis densos, y tinción de frotis finos (OIE, 2010).

#### **6.1.1.1. Gota gruesa**

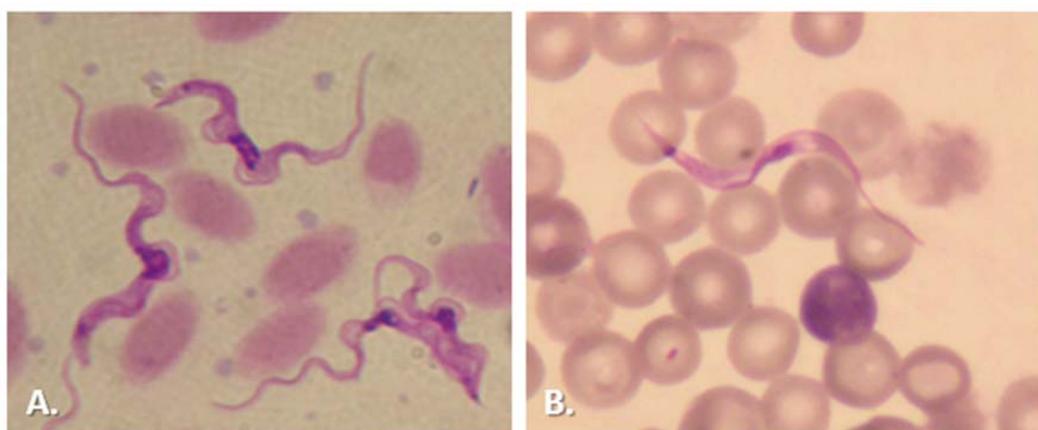
La técnica de la gota gruesa es un método rápido y poco costoso, que se realiza con una pequeña gota de sangre de unos 2-3  $\mu$ l. Se trata de un método con una sensibilidad baja de aproximadamente 10 tripanosomas por microlitro, lo cual corresponde a una tasa de parasitemia propia de infestaciones agudas o iniciales (OIE, 2010).

### 6.1.1.2. Tinción de frotis denso

La técnica de tinción de frotis denso emplea una gota de sangre de 10  $\mu$ l colocada en el centro de un portaobjetos y que se extiende en una pequeña área de alrededor 1 cm de diámetro. La extensión de sangre se tiñe sin haberse fijado previamente, lo cual como ventaja permite visualizar los parásitos en mayor medida debido a la hemólisis de los eritrocitos no fijados. Como desventaja, esta técnica no puede ser utilizada para determinar morfológicamente los tripanosomas porque pueden resultar dañados (OIE, 2010).

### 6.1.1.3. Tinción de frotis fino

La técnica de tinción de frotis fino emplea una gota de sangre de 3-5  $\mu$ l, colocada al principio de un portaobjetos, que es extendida a lo largo del mismo como una capa fina, utilizando para ello otro portaobjeto de vidrio. La extensión se fija con metanol y a continuación se tiñe con Giemsa o mediante tinciones rápidas, como por ejemplo Diff-Quick<sup>®</sup>, también llamado Panóptico rápido. La tinción de frotis fino presenta una baja sensibilidad, pudiendo detectar parasitemias solamente con una tasa mayor de 500.000 tripanosomas por mililitro de sangre (OIE, 2010).



**Figura 8.** (A) Frotis fino con sangre de dromedario parasitado por *T. evansi*. (B) Frotis fino con sangre de rata parasitada por *T. lewisi*.

### **6.1.2. Métodos de concentración**

En la mayoría de los hospedadores, *T. evansi* puede inducir una clínica leve o un estado subclínico de portador con baja parasitemia, en los cuales resulta difícil poner de manifiesto los parásitos. En estas circunstancias, los métodos de concentración son necesarios ya que incrementan la sensibilidad al examen microscópico (OIE, 2010).

Como técnicas de concentración descritas para el diagnóstico de *T. evansi* figuran la técnica de centrifugación del microhematocrito (conocida también como técnica de Woo o MHCT, mHCT o HCT), la técnica de la capa de leucocitos en campo oscuro o contraste de fases (conocida también como técnica de Murray o BCM, *-Buffy Coat Method-*), y por último la técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación (OIE, 2010).

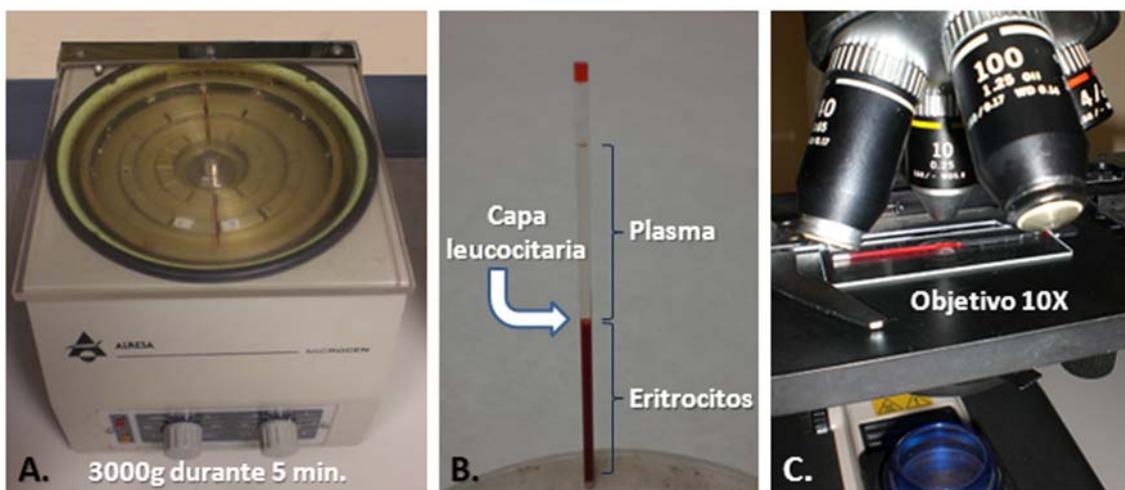
Tanto la técnica de Woo, como la técnica de Murray permiten estimar la anemia a través de la medida de volumen que ocupan los eritrocitos sedimentados por la centrifugación en los capilares. Esto puede ser utilizado en estudios de rebaños en riesgo, de forma que el valor del hematocrito puede ser un indicador para seleccionar un subconjunto de muestras y realizar análisis complementarios, como la PCR (OIE, 2010).

#### ***6.1.2.1. Técnica de Woo o de concentración del microhematocrito (MHCT, mHCT o HCT)***

El método de concentración del hematocrito (MHCT, mHCT o HCT) también llamado técnica de Woo, consiste en la centrifugación de un volumen de 70 microlitros de sangre en tubos capilares durante 5 minutos a 3000g (alrededor de 12000 rpm en una centrífuga de hematocrito), para luego examinar el capilar al microscopio bajo el objetivo 10x, colocándolo directamente sobre un porta, pudiéndose observar los tripanosomas en movimiento en la interfase entre el plasma y la capa leucocitaria, también denominada esta última fase como capa “buffy coat” (Woo, 1970; OIE, 2010).

Esta técnica de diagnóstico rápido y poco costosa muestra además si el animal está anémico (Desquesnes, 2004). No obstante, se recomienda realizar la técnica de Woo

dentro de las tres horas posteriores a la toma de la sangre; es mejor mantener las muestras a 4° C y preservadas de forma cuidadosa de la exposición directa a la luz solar ya que hace que los parásitos sean indetectables después de la primera media hora (Holland *et al.*, 2001).



**Figura 9.** Técnica de Woo: (A) Centrifuga para centrifugación de tubos capilares. (B) Fases que se definen en el capilar por gradientes de concentración tras la centrifugación. (C) Colocación del tubo capilar sobre un portaobjeto para posterior visualización de tripomastigotes móviles sobre la capa leucocitaria.

Analizando sangre de caballos infestados se obtuvo una sensibilidad del 71,1 % para el MHCT (Monzón *et al.*, 1990). En un estudio experimental en búfalos, se alcanzó una sensibilidad muy parecida a la cuarta semana post-infestación, en este caso del 72%, obteniéndose valores de sensibilidad del 100% a partir de la séptima semana, con pequeñas variaciones hasta el final del estudio (Holland *et al.*, 2001).

En un estudio experimental en ratones inoculados con *T. evansi* se obtuvo un porcentaje de detección del 60% a través de la técnica de Woo, llegando a ser este método dos veces más sensible que el método de la gota gruesa, probablemente porque el método MHCT utiliza mayor volumen de sangre (70-75 microlitros) que la gota gruesa (5 microlitros) y los parásitos se concentran cerca de la capa leucocitaria, lo cual facilita su observación (Fernández *et al.*, 2009).

En conejos inoculados experimentalmente con *T. evansi* solamente se pudo detectar la parasitemia con la técnica de Woo en la fase aguda, con un porcentaje de detección del 100%, pero fue imposible el diagnóstico a través de este método tanto en la fase crónica como en el periodo de prepatencia, mostrando una tasa de detección total para todo el curso de la infestación del 59%. Se ha concluido que este método de concentración es efectivo para la detección de los parásitos en parasitemias altas, pero presenta limitaciones para la detección en caso de baja parasitemia, lo cual es característico de las fases crónicas (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).

De acuerdo a Holland *et al.* (2001), a través del método de concentración del hematocrito se puede clasificar y estimar la parasitemia de acuerdo a los tripanosomas visualizados por capilar:

Puntuación	Tripanosomas por capilar	Parasitemia estimada (triplanosomas/ ml sangre)
5+	Enjambre en capa leucocitaria	$>10^6$
4+	$>100$	$>10^5-10^6$
3+	11-100	$>10^4>10^5$
2+	2-10	$>10^3>10^4$
1+	1	$2,5 \times 10^2-10^3$
0	0	$<2,5 \times 10^2$

**Tabla 1.** Parasitemia estimada de acuerdo a la técnica de Woo (MHCT) (Holland *et al.*, 2001)

Una variante del MHCT es la “técnica de doble centrifugación”, que consiste en realizar una segunda MHCT partiendo esta vez de la capa leucocitaria obtenida en una primera centrifugación. Este procedimiento convierte esta alternativa en una técnica más exigente y que ofrece sólo una ligera mejora en la sensibilidad, mientras su reproducibilidad no resulta tan buena (Desquesnes, 2004).

Por otro lado y a modo documental, existe otro método alternativo a la técnica de Woo, denominado con las siglas QBC (*Quantitative Buffy Coat method*) o técnica leucocítica cuantitativa. La relevancia de esta técnica para el diagnóstico de la enfermedad del sueño en humanos está todavía en investigación y su sensibilidad ha sido tema de controversia entre autores. No se ha contemplado su uso en medicina veterinaria debido a los costes prohibitivos de los tubos especiales que emplea el método (Desquesnes, 2004).

#### **6.1.2.2. Técnica de Murray o de la capa de leucocitos en campo oscuro o contraste de fases (BCM o BCT)**

La técnica de Murray o de la capa de leucocitos en campo oscuro o contraste de fases, también denominadas BCM (*Buffy Coat Method*) o BCT (*Buffy Coat Technique*), es un método muy parecido a la técnica de Woo descrita anteriormente, pero en vez de realizarse una observación directa del capilar centrifugado al microscopio sobre un porta objetos, se corta el capilar unos 5 mm por debajo de la capa leucocitaria y se vierte ésta en un porta, colocando encima un cubre objetos y de esta forma se realiza la observación al microscopio (Murray *et al.*, 1977; OIE, 2010).

La sensibilidad relativa de la técnica de concentración del microhematocrito (MHCT) y de BCM ha sido tema de controversia entre autores y según la especie de tripanosoma objeto de estudio (Desquesnes, 2004). Así, de acuerdo a Murray *et al.* (1977), quienes describieron por primera vez esta técnica utilizando sangre de vacas para diagnóstico de varias especies de tripanosomas, aunque no fue testada en ese momento para *T. evansi*, este método constituye una técnica más fiable que los métodos de inoculación en animales, técnicas de examen directo al microscopio u otras técnicas de concentración. No obstante, aplicando BCM para diagnóstico de *T. evansi* sobre sangre de caballos y búfalos, se obtuvo menos sensibilidad que utilizando otros métodos de concentración e inoculación de ratones (Monzón *et al.*, 1990; Holland *et al.*, 2001).

Por otro lado, además de la capacidad diagnóstica *per se* del BCM, Murray *et al.* (1977) apuntaron al mismo tiempo a la utilidad que tenía este método para la identificación de los tripanosomas, basada en un patrón de comportamiento mostrado por las distintas

especies estudiadas. No obstante, actualmente no se cita la posibilidad de este método para diferenciar *T. evansi* de otras especies, utilizándose otros métodos para tal fin (OIE, 2010).

#### **6.1.2.3. Técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación**

La técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación desarrollada por Lanhan y Godfrey (1970), tiene como fundamento separar los tripanosomas de las células sanguíneas a través de la carga, siendo estas últimas más negativas y quedando adheridas a una columna de dietilaminoetil celulosa (DEAE-celulosa), mientras los tripanosomas son eludidos reduciendo su viabilidad y capacidad infestiva.

Dado que las cargas superficiales difieren entre especies de tripanosomas de la sección Salivaria y que la carga negativa de los eritrocitos también varía entre las distintas especies mamíferas, la técnica debe por tanto ser adaptada a la especie de tripanosoma y a la especie hospedadora (Gutiérrez *et al.*, 2004b).

Aplicando la técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación sobre sangre de búfalos infestados experimentalmente, se obtuvo una sensibilidad del 100 % a partir de la séptima semana hasta la decimoquinta semana, donde se fijó el final del experimento. Se demostró de esta forma la alta sensibilidad del método, excepto en infestaciones muy recientes, siendo esta sensibilidad inferior a la obtenida por PCR o inoculación en ratones (Holland *et al.*, 2001).

Aplicando la técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación sobre sangre de cabras inoculadas experimentalmente se obtuvieron resultados similares, siendo esta técnica más sensible que la tinción de frotis y BCM, pero menos sensible que la inoculación en ratones, concluyéndose que en caso de bajo grado de parasitemia en cabras, éste es un método adecuado para el diagnóstico cuando otros tests no han sido efectivos (Gutiérrez *et al.*, 2004b).

Reid *et al.* (2001) utilizaron la capa *buffy* en vez de sangre entera en la técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación obteniendo una sensibilidad diez veces mayor. A

pesar de que esta técnica ha sido desarrollada para diagnóstico de tripanosomosis en humanos, usualmente se emplea para purificación de los parásitos (OIE, 2010).

### **6.1.3. Inoculación en animales**

La inoculación de animales de laboratorio, generalmente ratones y ratas, puede realizarse para revelar infestaciones subclínicas en animales domésticos (OIE, 2010). Ha sido considerada como método estándar para la detección de infestaciones por *T. evansi* (Reid *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2008).

La sensibilidad obtenida en la inoculación de ratones con sangre procedente de búfalos inoculados experimentalmente con *T. evansi* ha sido superior a la de otras técnicas como la de Woo y la del mini-intercambio aniónico y centrifugación. La inoculación en ratones alcanzó un 100 % de detección semanal a partir de la sexta semana en adelante, con escasas variaciones hasta el final del estudio que fue de 15 semanas. En contraste, la sensibilidad de la inoculación en ratones en general fue inferior a la obtenida por PCR, excepto en las dos primeras semanas de este estudio, momento en el cual la inoculación en ratones se mostró como la prueba más sensible (Holland *et al.*, 2001).

En otro estudio realizado en caballos se utilizó también la técnica de la inoculación experimental. Aunque la inoculación en ratones no alcanzó la sensibilidad del 100 %, el porcentaje de detección fue superior a los obtenidos por MHCT y BCM, mostrándose como una técnica adecuada cuando se requiere alta sensibilidad en la detección de *T. evansi* (Monzón *et al.*, 1990). En cabras inoculadas experimentalmente se obtuvo una sensibilidad diagnóstica a través de inoculación de ratones superior a la obtenida por la técnica del mini-intercambio aniónico y centrifugación (Gutiérrez *et al.*, 2004b).

Una mejora en la eficacia de este método se consigue a través de inoculación en roedores de la capa *buffy* en vez de sangre entera, obteniéndose un incremento de aproximadamente diez veces en la sensibilidad y pudiéndose de esta forma detectar una concentración tan baja como de 1,25 tripanosomas por mililitro de sangre (Reid *et al.*, 2001).

A pesar de que el período de incubación observado en los roedores es normalmente corto, entre dos y cinco días, éste puede extenderse hasta dos semanas, dependiendo de la cepa inoculada, concentración del inóculo, así como de la línea de animal de laboratorio empleada, influyendo así todos estos factores en la virulencia de *T. evansi* (OIE, 2010).

La inoculación de roedores, a pesar de su alta eficacia en la detección, puede no ser recomendada para diagnóstico de campo debido al coste de los animales de laboratorio, falta de instalaciones en el campo y el tiempo necesario que toma este método para revelar la positividad de las muestras; sin embargo, en laboratorio puede utilizarse como prueba de confirmación (Pathak *et al.*, 1997).

En caso de ser muy importante detectar un hospedador potencialmente infestado, como puede ser una importación a un área libre de la enfermedad, se puede justificar el empleo de roedores inmunodeprimidos por diferentes procedimientos (OIE, 2010).

#### **6.1.4. Detección de ADN tripanosómico**

##### **6.1.4.1. PCR convencional**

La detección de ADN tripanosómico es el fundamento de los denominados métodos de biología molecular para el diagnóstico de *T. evansi*. Actualmente la reacción en cadena de la polimerasa constituye la técnica de uso rutinario dentro de los métodos moleculares y se basa en la detección del agente infestante tras la amplificación de material genético procedente del mismo. Se trata del método de mayor sensibilidad para la detección de la infestación por *T. evansi*, pudiéndose llevar a cabo a varios niveles taxonómicos (OIE, 2010).

Teniendo en cuenta que el ADN tripanosómico no se mantiene en la sangre de los hospedadores por un tiempo superior a 24-48 horas una vez que los tripanosomas han muerto, la detección de este material puede ser un medio adecuado para identificar animales con una infestación activa (OIE, 2010). Se ha demostrado que la señal de la

PCR se torna negativa a las 24 horas de la administración de tratamiento tripanocida (Holland *et al.*, 2001).

La principal ventaja de la PCR radica en su especificidad de especie, siendo superior a cualquier otra técnica a este respecto, mostrándose así como una herramienta esencial capaz de identificar varias especies de tripanosomas que estén presentes en una población objeto de estudio, ya sean procedentes de animales hospedadores y/o insectos vectores (Desquesnes, 2004).

La PCR tiene además la ventaja de que las muestras de ADN pueden ser almacenadas para análisis posteriores, y las muestras de sangre puede incluso almacenarse en papel de filtro, permitiendo llevar a cabo estudios epidemiológicos en regiones remotas donde la accesibilidad y las condiciones para almacenar otro tipo de muestras presentan dificultades (Fernández *et al.*, 2009; Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).

En el diagnóstico de *T. evansi* en distintas especies hospedadoras, la PCR ha mostrado un porcentaje de detección superior a los obtenidos por otros métodos serológicos, de concentración y/o directos (Holland *et al.*, 2001; El-Metanawey *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2009; Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).

Varios factores como el nivel de parasitemia, cantidad de ADN del parásito en la muestra de sangre, métodos de extracción de ADN utilizados, diversidad de las cepas de ADN y/o diferencias en los programas de la PCR o de la concentración de los cebadores influyen en la sensibilidad, no siendo ésta una constante numérica y divergiendo de unos trabajos a otros según los autores (Fernández *et al.*, 2009).

Algunas técnicas para preparar las muestras de sangre (*buffy coat*, papel de filtro, sedimentación de plasma centrifugado, tratamiento con resina, purificación de ADN) pueden aumentar la sensibilidad diagnóstica al utilizar una PCR (Desquesnes, 2004). De esta forma, la sensibilidad obtenida fue superior cuando se partió de ADN tripanosómico purificado en vez de utilizarse sangre entera, debido a que de la primera forma se reduce cualquier tipo de interacción con el ADN del hospedador (Fernández *et al.*, 2009; Pruvot *et al.*, 2010).

A pesar de que la PCR ofrece la sensibilidad y especificidad requerida para la detección de la infestación por tripanosomas, puede también presentar resultados falsos negativos (OIE, 2010). Aunque en teoría la PCR muestra una sensibilidad diagnóstica muy alta, detectando incluso una única molécula de ADN en una muestra, este método presenta como limitación biológica los periodos de aparasitemia que pueden aparecer en el curso de la enfermedad, momentos en los cuales la detección de los parásitos no es posible porque no se encuentran circulantes en el torrente sanguíneo (Desquesnes, 2004).

Otra de las limitaciones en el diagnóstico ocurre cuando aparecen tasas de parasitemia inferiores a un tripanosoma por volumen de muestra evaluada (Desquesnes, 2004). A pesar de que la PCR es una técnica muy sensible, no es capaz de detectar *T. evansi* en infestaciones tempranas (Holland *et al.*, 2001). Sin embargo y a este respecto, durante los periodos de baja parasitemia si existe un solo tripanosoma en la muestra a evaluar, la proporción del ADN del agente infestante en relación al ADN total contenido en la muestra de sangre, constituye un factor crucial para el diagnóstico de la enfermedad. De esta forma, cuando se utiliza la PCR para diagnóstico de tripanosomas es necesario tener en cuenta la calidad del ADN y por lo tanto el método de extracción utilizado para esta molécula (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).

Así, cuando existen parasitemias inferiores a  $10^3$  parásitos/ml, en el periodo prepatente es necesario al menos 100ng de ADN en la muestra para asegurar la detección del parásito a través de PCR, apareciendo por debajo del nivel de detección y generando falsos negativos con cantidades inferiores (10ng) (Fernández *et al.*, 2009). Dependiendo de la cantidad inicialmente utilizada de ADN, cuando fue extraído de la *buffy coat* se observó además que aumentando la cantidad de 100 a 300 ng de ADN, se pudo obtener el diagnóstico positivo de *T. evansi* unos tres-cuatro días antes durante el periodo de prepatencia. En el caso de la fase crónica de la enfermedad solamente se pudo detectar presencia del protozoo utilizando una cantidad inicial de 300 ng, pero no con 100 ng (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).

En contraste, cuando se partía de muestras de sangre con alta parasitemia, al utilizarse 300 ng de DNA, la PCR diseñada con algunos cebadores se inhibía total o parcialmente, lo que se atribuía a un exceso en la cantidad de ADN en la reacción (Fernández *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta por tanto que la sensibilidad de la PCR depende de la cantidad de ADN disponible y que es proporcional a la parasitemia, teóricamente esta técnica es más sensible en la detección de *T. evansi* en especies hospedadoras altamente susceptibles como camellos, caballos y perros, que en especies hospedadoras con susceptibilidad media o baja (OIE, 2010).

De acuerdo con Fernández *et al.* (2009), otro factor que contribuye a la sensibilidad de la PCR es la selección de una secuencia apropiada para el diseño de los cebadores específicos. Existen dos parámetros que contribuyen a la selección de la secuencia para el diseño de los cebadores, que se citan a continuación pero que podrían no ser logrados para esta especie dado que el genoma completo de *T. evansi* no ha sido secuenciado todavía:

- La similitud entre los cebadores y la secuencia seleccionada, teniendo en cuenta la complementariedad de bases y la conservación de las secuencias. Se establece que a mayor conservación de la secuencia, mayor es la probabilidad de que los cebadores reconozcan la secuencia seleccionada en diferentes organismos del mismo género.
- El número de copias de la secuencia elegida presente en el genoma del parásito, lo cual está directamente correlacionado a la probabilidad de obtener un producto de amplificación por PCR y por consiguiente asociado a la sensibilidad del método.

Sin embargo, por lo general se utiliza el genoma referenciado de *Trypanosoma brucei* (Berriman *et al.*, 2005) para el diseño de cebadores en la especie *T. evansi* debido a la homología genética entre las dos especies y al hecho de que ambas especies están contenidas en el mismo grupo (Fernández *et al.*, 2009).

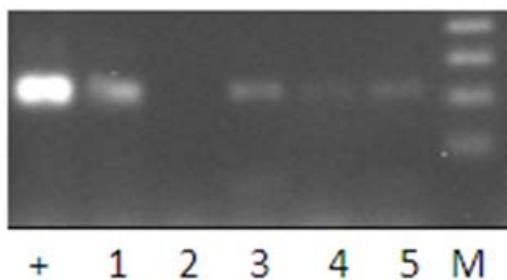
La OIE (2010) recomienda la PCR basada en los cebadores NRP (Moser *et al.*, 1989) y TBR (Masiga *et al.*, 1992), para detección del subgénero *Trypanozoon*, como el método de referencia dentro de la aplicación de esta técnica. Respecto a esta última pareja de cebadores diseñadas hace casi veinte años, denominados TBR 1 y TBR 2 (Masiga *et al.*, 1992), y de acuerdo a lo anterior (OIE, 2010), se realizó una comparativa frente a otras cinco parejas de cebadores que ya han mostrado su habilidad para amplificar el ADN de

*T. evansi*, confirmándose que TBR mostraba la mayor sensibilidad, permaneciendo como la referencia para la detección de *Trypanozoon* (Pruvot *et al.*, 2010).

Así, los cebadores TBR 1 y TBR 2 presentaban un límite de detección de parasitemia entre 10 y menos de 1 tripanosoma/ml y fueron capaces de detectar hasta 0,01pg (Pruvot *et al.*, 2010) e incluso 0,001pg (Fernández *et al.*, 2009) de ADN purificado.

De acuerdo con Claes *et al.* (2004), la amplificación por PCR del gen que codifica para la VSG RoTat 1.2 (Rode *Trypanozoon* antigen type 1.2) es un marcador específico para las cepas de *T. evansi*, y es especialmente útil en cepas diskinetoplásticas donde los marcadores basados en el ADNk podrían fallar en la amplificación. No obstante, el procedimiento anterior de identificación no sería aplicable a las cepas de *T. evansi* encontradas en Kenia que no se pueden identificar a través de RoTat 1.2, para las cuales ha sido diseñado una PCR específica para cepas non-RoTat 1.2 (Ngaira *et al.*, 2005).

El diagnóstico a través de PCR podría permitir comenzar el tratamiento de la enfermedad de forma temprana antes de la aparición de la sintomatología clínica, y prevenir así el deterioro físico del animal (Ramírez-Iglesias *et al.*, 2011).



---

**Figura 10.** Electroforesis para producto de PCR. Fotografía de una electroforesis donde se observan fragmentos de ADN utilizando cebadores descritos por Wuyts *et al.*, (1994) que dan lugar a productos de amplificación de 227pb. Las muestras objeto de análisis proceden de sangre de dromedarios infestados por *T. evansi*. Gel teñido con bromuro de etidio (0,5mg/L) y análisis de imagen realizado con un transiluminador UV (Bio-Rad Gel Doc <sup>TM</sup> EQ). Lectura: +: control positivo; 1 y 3: bandas positivas; 4 y 5: bandas débiles; 2: no se observa producto de amplificación; M: marcador con escalones de 100 pb.

---

#### **6.1.4.2. Sondas de ADN recombinante**

Otro procedimiento que se empleó hace más de veinte años para la detección de *T. evansi* fueron las sondas de ADN recombinante, diseñadas a partir de ADN genómico y ADN kinetoplástico (Viseshakul y Panyim, 1990; Masiga y Gibson, 1990). La sensibilidad y la especificidad son criterios importantes en un método de identificación, dando cuenta de ello en el caso de las sondas de ADN, sobre la base de la detección de elementos repetitivos del ADN que son específicos de especie (Gibson, 2002).

A principios de la pasada década Basagoudanavar *et al.* (2001) realizaron identificación de *T. evansi* por hibridación del ADN a través de una sonda de ADN no radiactiva, con las ventajas de la disminución del riesgo asociado a los radioisótopos, menor coste que la PCR y relativa simplicidad; sin embargo la sensibilidad mostrada por la PCR fue superior, en referencias citadas anteriormente a esta descripción.

Actualmente las referencias en la bibliografía sobre empleo de esta metodología aplicada a la identificación de *T. evansi* son escasas, y de acuerdo a la OIE (2010), las sondas de ADN no se usan rutinariamente. Es necesaria una evaluación en mayor profundidad de su potencial como método diagnóstico, siendo la PCR la técnica generalmente elegida y usada de rutina.

#### **6.1.4.3. PCR cuantitativa**

Aunque la PCR convencional es una técnica rápida y sensible, no permite cuantificar el nivel de parasitemia en el animal infestado, para lo cual Taylor *et al.* (2008) aplicaron una nueva técnica de identificación para *Trypanosoma evansi*, denominada TaqMan, basada en la PCR en tiempo real, teniendo como objetivo la secuencia del gen ITS-1 del ARN ribosómico de *T. evansi*, para la cual obtuvieron una mayor sensibilidad que con la técnica de Woo, pero inferior a la obtenida por la inoculación de ratones. No obstante, este método está en desarrollo y necesita una mayor evaluación y validación (OIE, 2010).

Más recientemente Konnai *et al.* (2009) aplicaron PCR en tiempo real, utilizando cebadores específicos teniendo como objetivo de los mismos el gen VSG RoTat 1.2 de *T. evansi*, pero obtuvieron una pobre sensibilidad de detección, superior a 25 tripanosomas/ml de sangre, y un límite de detección cuantitativo de 100 tripanosomas/ml de sangre, por lo cual se requiere perfeccionar la aplicación de esta técnica de cara a mejorar su sensibilidad en el futuro.

A pesar de que las técnicas de PCR convencional y cuantitativa no presentan apenas ventajas en término de sensibilidad en comparación con la técnica de inoculación en ratón, presentan sin embargo ventajas innegables de rapidez y comodidad que las convierten en instrumentos epidemiológicos potenciales (Antoine-Moussiaux y Desmecht, 2008b).

#### **6.1.4.4. Amplificación isotérmica tipo LAMP**

Otra aplicación reciente de la biología molecular al diagnóstico de la surra es la técnica de amplificación isotérmica mediada por asa, también denominada tipo LAMP, que está en desarrollo para *T. evansi* y necesita evaluación y validación en mayor profundidad (OIE, 2010), existiendo pocas referencias al respecto.

Este método novedoso, desarrollado por Notomi *et al.* (2000), consiste en una amplificación de una cantidad que puede ser de unas pocas copias de ADN y se consiguen  $10^9$  copias en menos de una hora bajo condiciones isotérmicas, presentando alta especificidad y eficiencia. Tiene como base la intervención de una ADN polimerasa y un grupo de cuatro cebadores especialmente diseñados que reconocen un total de seis secuencias distintas del ADN objeto de la amplificación. Como infraestructura en el laboratorio es necesario un bloque de calor o un baño María.

En la primera referencia de aplicación de este método en *T. evansi* se obtuvo un mayor porcentaje de detección de positivos a través de LAMP que a través de PCR y otros métodos parasitológicos cuando se excluyó como método estándar de oro la inoculación en ratones, que mostró la mayor sensibilidad; sin embargo cuando no se excluyó la inoculación en ratones como método estándar de oro, la sensibilidad mayor la mostró la

técnica de Woo y le siguió el método LAMP y PCR en orden decreciente (Thekiso *et al.*, 2005).

Recientemente se ha desarrollado un test de amplificación isotérmica LAMP para *T. evansi* tipo B, que muestra como características una sensibilidad analítica alta de 0,1 tripanosoma/ml, alta especificidad, posibilidad de la inspección visual de los resultados, y además presenta una mejora en el porcentaje de detección y en el tiempo requerido con respecto a la PCR convencional (Njiru *et al.*, 2010).

### **6.1.5. Detección antigénica**

Otro modo de detectar infestaciones activas por *T. evansi* consiste en la detección de antígenos circulantes en sangre o suero (OIE, 2010). La detección de antígenos está basada en enzimoimmunoanálisis tipo sándwich (Luckins y Dwinger, 2004). Este procedimiento de detección de antígenos, también denominado ELISA inmunocaptura o Ag-ELISA, fue desarrollado para diagnóstico de *T. evansi* inicialmente empleando anticuerpos policlonales (Rae y Luckins, 1984) y posteriormente empleando anticuerpos monoclonales (Nantulya *et al.*, 1989), presentando estos últimos anticuerpos la ventaja de que pueden ser sintetizados en mayor escala y permiten mayor reproducibilidad frente al método que emplea anticuerpos policlonales (Desquesnes, 2004).

La detección de infestaciones activas a través de detección de antígenos que teóricamente fuera sensible y específica, podría solventar el problema que presentan otros métodos, como por ejemplo los basados en detección de anticuerpos los cuales pueden dar resultados positivos por un tiempo una vez tratada la enfermedad; sin embargo en la práctica, la detección antigénica a través de los métodos disponibles no ha cumplido con estos ideales y por tanto no ha logrado convencer a la comunidad científica como método diagnóstico sólido (Desquesnes, 2004).

Así, en una evaluación preliminar de métodos diagnósticos para surra en caballos en la cual se aplicaron entre otros, dos métodos de detección de antígenos, se observó a través de Ag-ELISA que aunque los niveles antigénicos descendieron después del tratamiento, éstos no alcanzaron los niveles previos a la infestación. Con el método denominado

Suratex, que es una prueba comercial de aglutinación de antígeno con látex, se observó tras el tratamiento disminución antigénica a niveles previos a la inoculación, pero no en todos los animales estudiados (Wernery *et al.*, 2001).

Recientemente se ha caracterizado el anticuerpo monoclonal 2-4F6 IgM y se ha citado su potencial para su empleo en la detección de antígenos, aunque para ello se requieren futuras evaluaciones (Monzón, 2006). De acuerdo a la OIE (2010), los intentos realizados para desarrollar los tests de detección antigénica no han alcanzado hasta el momento un nivel satisfactorio como para ser recomendados en el diagnóstico rutinario de *T. evansi*.

## 6.2. Métodos serológicos

Aunque la detección de anticuerpos no puede distinguir entre infestaciones activas o ya pasadas, los métodos serológicos tienen un valor muy importante como herramientas epidemiológicas para evaluar la prevalencia de la enfermedad (Desquesnes, 2004).

De forma histórica se han utilizado métodos bioquímicos para detectar incrementos de anticuerpos no específicos presentes en los casos de surra, pudiendo ser este incremento de globulinas no específico por la infestación de *T. evansi*. Entre estas técnicas figuran los tests de floculación, precipitación de cloruro de mercurio y turbidez del timol, los cuales hoy en día están desfasados. Únicamente el test de formol gel puede todavía tener alguna utilidad a nivel de campo ya que es de uso sencillo, pero también presenta como limitación la detección de anticuerpos no específicos y además solamente ha sido validado en camellos (OIE, 2010). Hassan *et al.* (2005) citaron como principal desventaja el valor predictivo demasiado bajo observado con los tests bioquímicos para la detección de la infestación por *T. evansi*, por lo que recomendaron métodos de diagnóstico más específicos.

Para la detección, en este caso, de anticuerpos específicos producidos como respuesta frente a antígenos de *T. evansi* se utilizan actualmente diferentes tests como la inmunofluorescencia indirecta, la inmunotripanolisis y las técnicas estandarizadas más sencillas de ELISA y CATT/ *T. evansi*, habiendo sustituido estos dos últimos métodos

citados a otros como los de aglutinación directa o indirecta y fijación del complemento, que hoy en día apenas se utilizan (OIE, 2010).

Desquesnes *et al.* (2009b) plantearon la hipótesis de la baja sensibilidad que pueden presentar métodos serológicos como el CATT/ *T. evansi* y ELISA en el caso de que se produzca un periodo latente de la infestación en el cual el parásito se aloje en focos extravasculares tales como sistema nervioso, articulaciones y cámara posterior del ojo, y de esta forma se produzca un pobre reflejo en el sistema inmunológico del hospedador.

La mayoría de los test serológicos utilizados para chequear infestaciones por *T. evansi* han sido diseñados originalmente para detección de otros *Trypanosoma* spp. africanos, no siendo por tanto considerada la detección de anticuerpos específica de especie, debido a que los tripanosomas podrían compartir antígenos comunes (Desquesnes, 2004).

### **6.2.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)**

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) está basada en una interacción primaria antígeno-anticuerpo, la cual puede visualizarse posteriormente utilizando anticuerpos conjugados a un colorante fluorescente que reaccionan frente a la especie hospedadora objeto de análisis, a través de un microscopio de luz ultravioleta (Eisler *et al.*, 2004).

La técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizada en estudios a pequeña escala, consume mucho tiempo y presenta un coste medio de sus reactivos en torno a 0,5 € por test (OIE, 2010). No obstante, el microscopio de luz ultravioleta necesario para lectura de la fluorescencia emitida, supone una inversión económica elevada como equipamiento para llevar a cabo la técnica (Eisler *et al.*, 2004).

Tras infestaciones experimentales, la detección de anticuerpos frente a *T. evansi* mediante IFI fluctuó entre 12 y 15 días en perros (Aquino *et al.*, 1999), entre 13 y 29 días en caballos (Wernery *et al.*, 2001) y 60-90 días en pequeños rumiantes (Jacquiet *et al.*, 1993).

En general la sensibilidad de la IFI es buena, pero su especificidad es baja y pueden darse reacciones cruzadas (Desquesnes, 2004). En un estudio sobre epidemiología de tripanosomosis por *T. evansi* en camellos, la IFI mostró la mayor sensibilidad, pero la menor especificidad respecto a CATT/ *T. evansi* y ELISA, también evaluados (Dia *et al.*, 1997a). En caballos se requieren más estudios para determinar la sensibilidad y especificidad de la IFI (Wernery *et al.*, 2001).

Aparte de la baja especificidad, otras desventajas mostradas por la IFI son la subjetividad a la hora de interpretar los resultados y la pérdida de cuantificación de la respuesta de los anticuerpos (Eisler *et al.*, 2004). Este método fue ampliamente usado, particularmente para estudios epidemiológicos y ha sido sustituido por las técnicas de ELISA indirectas (detección de IgG) desde los años ochenta (Desquesnes, 2004).

### **6.2.2. Enzimainmunoensayo (ELISA indirecto o IgG-ELISA)**

Hace más de 30 años, Luckins *et al.* (1978) abrieron el camino a la aplicación del enzimainmunoensayo en el diagnóstico de infestaciones por *T. evansi*.

Cuando se utiliza un IgG-ELISA o ELISA indirecto en primer lugar se realiza extracción de antígenos de los tripanosomas, y con estos antígenos solubles se cubre las placas de poliestireno que actúan como fase sólida. A continuación, a estos antígenos se unen los anticuerpos específicos producidos por el hospedador contra los especímenes bajo investigación. Los complejos antígeno-anticuerpo se pueden a su vez detectar mediante anti-inmunoglobulinas de la especie hospedadora conjugadas con un enzima. La enzima puede ser la peroxidasa, la fosfatasa alcalina o cualquier otra enzima apropiada. La enzima conjugada unida al complejo antígeno/anticuerpo, reacciona a continuación con un substrato adecuado para producir un cambio de color característico del substrato mismo o de un indicador añadido (cromógeno), y la lectura se realiza visualmente o con un espectrofotómetro a la longitud de onda apropiada para el cromógeno (OIE, 2010; Desquesnes, 2004).

Las VSG podrían ser demasiado específicas para ser usadas como un antígeno universal en la aplicación de ELISA, teniendo en cuenta la presencia de cepas RoTat frente a otras

cepas de *T. evansi* non RoTat. En contraste, el ELISA que utiliza antígenos solubles procedentes del lisado de tripomastigotes enteros de *T. evansi* no es un método cepa-específico y por tanto está calificado como un test universal (OIE, 2010). Con respecto a esto, se ha confirmado resultados de reproducibilidad similares para el enzaimunoensayo con antígenos solubles parasitarios de cepas de *T. evansi* procedentes de orígenes geográficos muy distantes, lo cual permite un uso amplio a nivel mundial de antígenos procedentes del lisado de tripomastigotes enteros (Desquesnes *et al.*, 2009a). No obstante, teniendo en cuenta la posibilidad de aparición de reacciones cruzadas, deben hacerse por tanto consideraciones en áreas donde conviven múltiples especies de tripanosomas (OIE, 2010).

Se ha desarrollado recientemente un enzimoimmunoensayo que utiliza antígenos recombinantes y basado en una proteína no variable de superficie denominada ISG 75. Se ha indicado el potencial para el desarrollo de una nueva referencia diagnóstica de surra en camellos, al haberse comparado con otros métodos diagnósticos ya establecidos basados en la VSG RoTat 1.2 y presentar concordancia los resultados obtenidos; se indica también su aplicación en otras especies del subgénero *Trypanozoon* y en otras especies hospedadoras (Tran *et al.*, 2009).

En la puesta en marcha de un diagnóstico a través de ELISA, en cuanto al factor que supone en sí la especie hospedadora en estudio, se han utilizado anti-inmunoglobulinas conjugadas específicas dirigidas frente a inmunoglobulinas de especies hospedadoras estrechamente relacionadas (Verloo *et al.*, 2000), aunque se recomienda que se lleve a cabo utilizando anti-inmunoglobulinas conjugadas monoespecíficas (OIE, 2010). En especies donde no están disponibles anti-IgG conjugadas frente a inmunoglobulinas de la especie hospedadora en estudio, se han realizado pasos intermedios para producir inmunoglobulinas diana sobre las que utilizar luego anti-IgG conjugadas comerciales (Molina *et al.*, 2000; Atarhouch *et al.*, 2003). Como alternativa en estos casos, se ha empleado con éxito proteína A-peroxidasa (Desquesnes *et al.*, 2009b).

Se observó una alta sensibilidad diagnóstica de *T. evansi* mediante ELISA, presentando generalmente una especificidad que se incrementa al aumentar el corte del porcentaje de positividad que discrimina entre resultados positivos y negativos (Verloo *et al.*, 2000; Holland *et al.*, 2005).

En un estudio comparativo entre diferentes métodos diagnósticos el enzima inmunoensayo con respecto al CATT/*T. evansi* obtuvo una sensibilidad equiparable y una especificidad ligeramente inferior en búfalo, estableciendo como método estándar de oro la inoculación en roedores (Verloo *et al.*, 2000). En contraste, utilizando como pruebas de referencia las técnicas de concentración del hematocrito y del mini-intercambio aniónico y centrifugación en el diagnóstico para *T. evansi* en ganado vacuno, el ELISA presentó una especificidad superior al CATT/*T. evansi* y una sensibilidad inferior con respecto al CATT/*T. evansi* a dilución 1:4, dilución a la cual mostró este último método los valores más equilibrados para estos parámetros (Reid y Copeman, 2003). Tomando como método estándar de oro la inmunotripanolisis, en cerdos se obtuvieron valores ligeramente superiores de ambos parámetros en ELISA con respecto al CATT/*T. evansi* con la dilución 1:8 a la cual mostró en este caso este método de aglutinación los valores más equilibrados para estos parámetros (Holland *et al.*, 2005).

En camellos, utilizando el test de inmunotripanolisis como referencia se obtuvo para ELISA, utilizando como antígeno RoTat 1.2, una sensibilidad de 98,92% y una especificidad de 98,9%. Para un nuevo antígeno testado, ISG 75, se obtuvo una sensibilidad de 94,62% y una especificidad del 100% (Tran *et al.*, 2009).

A pesar de que por regla general es difícil determinar a través de métodos diagnósticos serológicos la diferencia entre infestaciones actuales o pasadas, Verloo *et al.* (2000) confirmaron en búfalos en Vietnam que el enzima inmunoensayo puede ser utilizado para identificar animales con una infestación activa en el momento de su aplicación. En la misma línea se planteó el ELISA como método adecuado para confirmar el status de cerdos infestados por *T. evansi* (Holland *et al.*, 2005).

El ELISA presenta mayor probabilidad de identificar correctamente animales no infestados, mientras que el CATT/*T. evansi* presenta mayor probabilidad de identificar correctamente a los infestados (OIE, 2010). En estudios recientes donde se aplicó el enzima inmunoensayo en el diagnóstico de *T. evansi*, se confirmó un valor predictivo negativo alto de la técnica (Desquesnes *et al.*, 2009a).

### 6.2.3. Prueba de aglutinación en tarjeta (CATT/ *T. evansi* y LATEX/*T. evansi*)

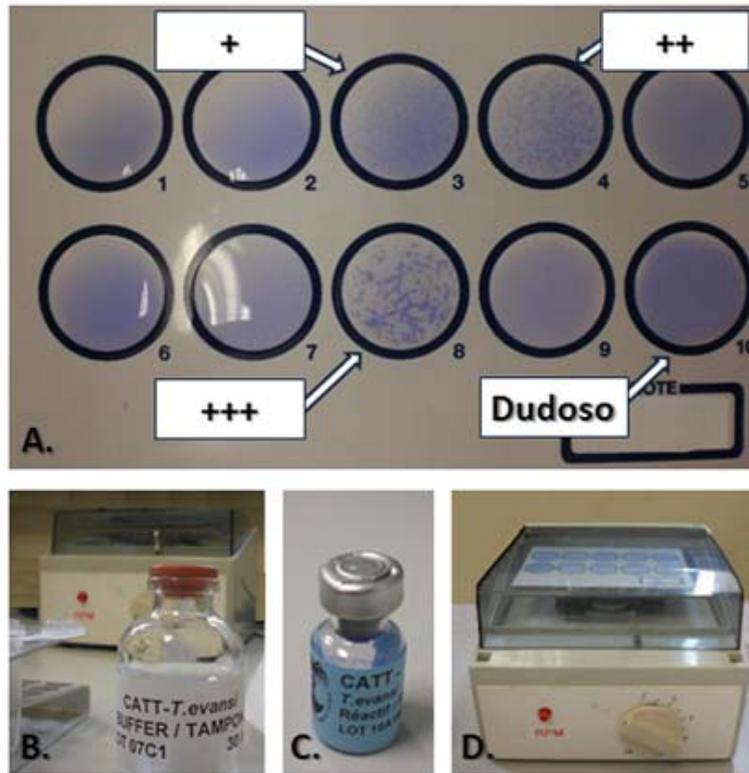
#### 6.2.3.1. CATT/*T. evansi*

La prueba de aglutinación sobre tarjeta fue inicialmente desarrollada por Magnus *et al.* (1978) con un propósito diagnóstico de la enfermedad del sueño en humanos, y se le denominó Testryp CATT. Diez años más tarde un test similar fue evaluado por Bajyana Songa y Hamers (1988) para el diagnóstico de la surra, basado en el uso del tipo antigénico variable RoTat 1.2. El repertorio de VSG de *T. evansi* es limitado y el tipo antigénico variable RoTat 1.2 presenta un carácter predominante, convirtiéndose en un buen candidato como reactivo diagnóstico en métodos diagnósticos basados en la detección de anticuerpos, como es el caso del CATT/*T. evansi* (Verloo *et al.*, 2001).

El test CATT/*T. evansi* ha sido validado como método diagnóstico de campo para la detección de *T. evansi* en camellos (Dia *et al.*, 1997a, b; Gutiérrez *et al.*, 2000; Ngaira *et al.*, 2003), búfalos (Davidson *et al.*, 1999; Verloo *et al.*, 2000) y vacas (Reid y Copeman, 2003). En cerdos los métodos de aglutinación se han citado como inadecuados para el diagnóstico serológico de surra, con disminución de sensibilidad y especificidad a medida que avanza el tiempo tras la infestación (Holland *et al.*, 2005).

Actualmente el test CATT/*T. evansi* está disponible en forma de kit con un coste medio de sus reactivos en torno a 0,5 €/test, procedente del Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo en Amberes, figurando actualmente este centro belga como laboratorio de referencia de la OIE para diagnóstico de esta enfermedad (OIE, 2010).

Este método se basa en una reacción de aglutinación directa que se produce cuando suero o plasma de un animal que presenta anticuerpos frente a *T. evansi* entra en contacto con parásitos liofilizados que expresan RoTat 1.2. Aunque el fabricante del CATT/*T. evansi* no especifica en el manual de instrucciones qué tipo de inmunoglobulinas detecta el test, se ha encontrado contradicción en la bibliografía acerca de este tema. Davidson *et al.* (1999) citan que principalmente detecta IgG, mientras que otras fuentes más recientes proponen la IgM como anticuerpo diana principal para este método (Desquesnes, 2004; OIE, 2010).



**Figura 11.** CATT/*T. evansi* (Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo, Amberes, Bélgica): (A) Interpretación de las aglutinaciones producidas. (B) Tampón para dilución de los sueros e hidratación del reactivo y los controles. (C) Reactivo compuesto por parásitos liofilizado que expresan el antígeno RoTat 1.2. (D) Rotator para la mezcla del suero y reactivo durante 5 min a 70 rpm.

De acuerdo al fabricante, el CATT/*T. evansi* es un método no estrictamente específico de especie, lo cual podría complicar la interpretación de los resultados en áreas donde existan otros tripanosomas de la sección Salivaria y, por tanto, se podrían obtener falsos positivos. La fiabilidad del test es robusta cuando es usado en una especie y/o una región con infestaciones monoespecíficas por *T. evansi* (Desquesnes, 2004).

Wernery *et al.* (2001) observaron en suero de caballos supuestamente libres de la enfermedad, aglutinaciones ligeras a través de CATT/*T. evansi* y sugirieron que el suero de los équidos podría haber reaccionado a otras proteínas en la suspensión de antígeno. Aparte de que con el CATT/*T. evansi* se pueden producir resultados positivos como consecuencia de reacciones inespecíficas, se ha citado como otro de los inconvenientes

que los resultados positivos no discriminan en el diagnóstico de la surra entre exposiciones previas o infestaciones activas (Konnai *et al.*, 2009).

Además de las posibilidades anteriormente citadas sobre resultados falsos positivos a través de este método diagnóstico, se han registrado también resultados seronegativos a través de CATT/*T. evansi* en animales parasitológicamente positivos, los cuales representarían por tanto resultados falsos negativos (Diall *et al.*, 1994; Dia *et al.*, 1997a, b; Ngaira *et al.*, 2003; Njiru *et al.*, 2004; El-Metanawey *et al.*, 2009). Como causas de este fenómeno se ha sugerido la presencia de cepas de *T. evansi* carentes del gen que codifica para la glicoproteína RoTat 1.2 y/o la no expresión de esta glicoproteína variable de superficie, así como infestaciones tempranas en las cuales los animales no han producido niveles detectables de anticuerpos (Njiru *et al.*, 2004). Se ha citado la aparición de anticuerpos específicos frente al tipo antigénico variable RoTat 1.2 entre 6 y 32 días tras la inoculación de *T. evansi* en conejos (Verloo *et al.*, 2001).

De acuerdo a la OIE (2010) el CATT/*T. evansi* detecta principalmente IgM, que son anticuerpos pentavalentes que presentan una vida media corta, por lo que se propone como un medio adecuado para la detección de infestaciones tempranas o tardías con circulación reciente de parásitos en el torrente sanguíneo, pudiendo detectar infestaciones activas con un valor predictivo positivo alto.

En estudios previos sobre camellos infestados de forma natural, utilizando CATT/*T. evansi* se obtuvieron respectivamente sensibilidades y especificidades del 89% y 73% en Mali (Diall *et al.*, 1994), 86,95% y 83,03% en Mauritania (Dia *et al.*, 1997b) y 100% y 96% en las Islas Canarias (Gutiérrez *et al.*, 2000). En contraste, se describieron valores más bajos de sensibilidad del CATT/*T. evansi*, de alrededor del 65%, en esta especie en Kenia (Ngaira, *et al.*, 2003; Njiru *et al.*, 2004), lugar donde se confirmaron cepas de *T. evansi* carentes tanto del gen que codifica para el antígeno RoTat 1.2 como de la glicoproteína asociada, así como cepas que presentaron el gen pero sin embargo ausencia de la proteína codificada en dicho gen (Ngaira *et al.*, 2004).

En una evaluación de varios métodos diagnósticos para detección de anticuerpos y antígenos en búfalo afectados de forma natural por surra, el CATT/*T. evansi* mostró una especificidad absoluta, superior a la de los otros métodos evaluados; la sensibilidad del

78%, fue inferior en este caso a la obtenida con ELISA para detección de IgG, que mostró la mayor sensibilidad entre los métodos utilizados (Davidson *et al.*, 1999). En contraste, aplicando el CATT/*T. evansi* sobre suero de vacas a dilución 1:4, la especificidad fue del 96% y la sensibilidad del 83%, siendo los valores de estos parámetros inferior y superior respectivamente que cuando se aplicó ELISA para detección de anticuerpos (Reid y Copeman, 2003).

De acuerdo a las indicaciones del fabricante, el CATT/*T. evansi* se realiza sobre suero o plasma preparados a una dilución 1:4 o 1:8, y para cada especie testada deben ser determinadas las condiciones óptimas. Se ha observado que conforme se emplean mayores diluciones, se mejora de forma moderada la especificidad, pero disminuye de forma drástica la sensibilidad (Verloo *et al.*, 2000; Reid y Copeman, 2003; Holland *et al.*, 2005).

Como ventaja, el CATT/*T. evansi* es un test rápido y fácil que se puede aplicar en condiciones de campo sin ningún equipamiento especial (Gutierrez *et al.*, 2000). No obstante, aunque la observación directa de los resultados obtenidos por el CATT/*T. evansi* es fácil, algunas veces la interpretación de la aglutinación producida puede ser distinta, aumentando así la probabilidad de error del operador (Reid y Copeman, 2003; Desquesnes, 2004).

Se ha apuntado al CATT/*T. evansi* como el método más común para clasificación correcta de animales verdaderamente infestados, y puede ser usado para seleccionar animales de forma individual para tratamiento con drogas tripanocidas (Davidson *et al.*, 1999; OIE, 2010).

#### **6.2.3.2. LATEX/*T. evansi***

Existe un formato alternativo al test CATT/*T. evansi*, denominado LATEX/*T. evansi* y que a diferencia del primero, consiste en una aglutinación indirecta pero basada también en la glicoproteína variable de superficie nativa RoTat 1.2, unida de forma covalente a partículas de látex. En la actualidad este método se encuentra en evaluación (OIE, 2010).

Este método se ha descrito como una herramienta epidemiológica adecuada en la surra en búfalos, para detectar infestaciones activas y anticuerpos específicos persistentes (Verloo *et al.*, 2000). En cambio, en cerdos se citó su limitado valor para diagnóstico serológico (Holland *et al.*, 2005).

En un estudio sobre cabras infestadas experimentalmente por *T. evansi* se obtuvieron resultados similares tanto con CATT/*T. evansi* como con LATEX/*T. evansi*, pero en la conclusión como método adecuado para evaluar la enfermedad en caprino sólo se citaba el primero de los métodos (Gutierrez *et al.*, 2004).

#### **6.2.4. Prueba de inmunotripanolisis (ITL)**

La prueba de inmunotripanolisis fue confirmada por Van Meirvenne *et al.* (1995) como una herramienta valiosa para el diagnóstico serológico en la enfermedad del sueño en humanos, basada en distintas poblaciones de *T. brucei gambiense* con distintos tipos antigénicos variables.

Este método adaptado al diagnóstico de tripanosomosis por *T. evansi*, está basado en la glicoproteína variable de superficie RoTat 1.2 y puede ser por lo tanto sólo positiva con hospedadores que producen inmunoglobulinas tripanolíticas dirigidas frente a este tipo de antígeno variable (OIE, 2010).

La prueba de inmunotripanolisis se realiza utilizando suero a dilución 1:4 del animal sospechoso de padecer surra, que se incuba junto a formas tripomastigotes vivos de *T. evansi* durante una hora, en presencia de suero de cobaya como complemento. Bajo el microscopio, cuando en el suero a testar están presentes anticuerpos específicos, en presencia del complemento se observa lisis de los tripanosomas que expresan el tipo antigénico variable RoTat 1.2. Las muestras se consideran positivas cuando se produce lisis como mínimo del 50% de los tripanosomas, indicando infestación actual o pasada (Verloo *et al.*, 2000, 2001).

La prueba de inmunotripanolisis ha sido citada como un método de referencia adecuado en búfalo, cerdos y camellos, para la detección de anticuerpos anti-RoTat 1.2 (Verloo *et al.*, 2000; Holland *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 2009).

Al tratarse de una prueba con una alta especificidad, se utiliza para confirmación individual de muestras sospechosas que eran positivas utilizando otros tests, presenta un coste bastante elevado (250€/test), y puede ser realizado bajo petición en el Instituto de Medicina Tropical de Amberes (OIE, 2010).

## **7. MEDIDAS DE CONTROL DE LA ENFERMEDAD**

El control de una enfermedad incluye todas las medidas destinadas a interferir en la aparición incontrolada de la misma. El objetivo del control de una enfermedad es la reducción de la morbilidad y mortalidad de la misma, lo que puede lograrse a través del tratamiento de los animales enfermos, lo cual reduciría la prevalencia, o a través de medidas preventivas, lo cual produciría también una reducción de la prevalencia y además un descenso de la incidencia (Thrusfield, 2007).

A pesar de que se ha notificado un caso de un animal afectado por *T. evansi* en el que se observó curación sin necesidad de tratamiento terapéutico (Dia *et al.*, 2000), este fenómeno no constituye la norma común. Así, el control y erradicación de la tripanosomosis es difícil debido al desarrollo de resistencia a las drogas empleadas, y a la complejidad del control de los vectores. Se necesita una monitorización regular de las infestaciones para evitar grandes pérdidas en áreas endémicas (Wernery y Kaaden, 2002).

Debido a la aparición de resistencia a la quimioterapia descrita en numerosas zonas del mundo, surge la necesidad de la denominada “estrategia frente a la enfermedad”, la cual requiere un conocimiento preciso de la interacción tripanosoma-hospedador, pudiéndose así definir nuevos puntos para establecer intervenciones curativas y preventivas (Antoine-Moussiaux *et al.*, 2009). En este sentido, recientemente se ha realizado un estudio proteómico de la infestación por *T. evansi* en roedores que supone un primer paso para la identificación de posibles candidatos para el posterior desarrollo de vacunas contra la enfermedad, así como también permite localizar nuevas dianas para medicamentos, localizar biomarcadores diagnósticos y ampliar el conocimiento de la biología de la enfermedad (Roy *et al.*, 2010).

### **7.1. Quimioterapia actual frente a la surra**

La quimioterapia sigue siendo la forma más eficiente en el control de la surra y depende del uso de cuatro drogas actualmente disponibles: aceturato de diminaceno, suramina,

quinapiramina y melarsamina. Mientras que los tres primeros componentes han sido utilizados por más de 50 años, la melarsamina fue desarrollada hace menos de 20 años. El uso inapropiado del limitado repertorio de drogas para luchar contra la enfermedad, puede permitir la aparición de variaciones en la sensibilidad a las mismas entre cepas de distinta procedencia geográfica, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas efectivas y más baratas (Gillingwater *et al.*, 2007).

Debido a esta necesidad de innovar en la terapia frente a la surra se han investigado nuevas moléculas relacionadas con familias de tripanocidas actualmente en uso (Gillingwater *et al.*, 2009, 2010), plantas medicinales tal como *Brucea javanica* como potenciales fuentes de nuevas drogas (Bawm *et al.*, 2008), e incluso se han analizado las posibilidades terapéuticas del plasma humano frente a *T. evansi* en un modelo murino infestado con dicho organismo (Otto *et al.*, 2011).

De acuerdo con Gillingwater *et al.* (2010), las cuatro drogas estándar disponibles para el tratamiento de la surra, son inadecuadas para el control de la enfermedad porque no están disponibles, o bien son económicamente demasiado costosas o presentan una pérdida de eficacia debido a la aparición de resistencias.

### **7.1.1. Diamidinas aromáticas**

Las diamidinas se acumulan de forma selectiva en el patógeno en vez de en las células del hospedador, y son captadas por sistemas transportadores. El mecanismo de acción se debe principalmente a la unión de la droga al ADN, lo que inhibe algunas enzimas como topoisomerasas o nucleasas, o directamente se produce un bloqueo de la transcripción. También podría tener importancia en la actividad de la droga la unión selectiva de la misma al ADN extranuclear, condensado en el kinetoplasto (Gillingwater *et al.*, 2010).

Dentro del grupo de las diamidinas aromáticas figura el aceturato de diminazeno, una droga tripanocida con actividad limitada frente a *T. evansi* (Holmes *et al.*, 2004). Este principio activo no autorizado para uso veterinario en España (AEMPS, 2011), se puede encontrar en el extranjero bajo distintas denominaciones comerciales, siendo Berenil<sup>®</sup> (Intervet, Schering-Plough Animal Health) la más conocida, entre otras como

Babenil<sup>®</sup> (Intervet, Schering-Plough Animal Health) , Veriben<sup>®</sup> (Ceva Santé Animale), Ganaseg<sup>®</sup> (Novartis), etc., y presenta también indicaciones terapéuticas de uso en otros procesos parasitarios como la piroplasmosis y tricomonosis, además de su uso frente a tripanosomosis.

En un modelo murino inoculado con *T. evansi*, el aceturato de diminazeno parecía tener la menor eficacia terapéutica dentro de las drogas estándar actualmente disponibles en el mercado (Gillingwater *et al.*, 2009).

De acuerdo a las indicaciones del fabricante de una de las presentaciones comerciales del diminazeno (Berenil<sup>®</sup>), este fármaco protege al ganado contra tripanosomosis durante 2-4 semanas, la vía de administración es intramuscular profunda y se indica una dosificación de 3,5 mg/kg en vacas, ovejas, caballos y perros, debiendo ser doblada la dosis en el caso de infestación por *T. evansi*, entre otros agentes citados para los que también hay indicación de uso. Otras fuentes consultadas señalan una dosis de 3,5-7 mg/kg y empleo de la droga en ganado vacuno y pequeños rumiantes, citándose un índice terapéutico bajo en perros y équidos (Holmes *et al.*, 2004).

Debido a que la tolerancia de los caballos al diminazeno es baja, no se recomienda para el tratamiento frente a tripanosomosis por *T. evansi* en esta especie (Desquesnes, 2004). En équidos afectados por surra en Tailandia, tras la primera inyección de una dosis de 3,5 mg/kg se observaron signos alérgicos leves, y tras la segunda inyección a los 41 días, estos signos alérgicos aumentaron su calificación de moderados a severos, los cuales obligaron a realizar tratamiento antihistamínico de choque en algunos casos, observándose una mejor recuperación en mulas que en caballos; sin embargo, ninguno de los animales mostró alteración en la función renal. Además, a pesar de que el primer tratamiento con este fármaco fue efectivo, en el segundo tratamiento todavía podía detectarse parasitemia a las 24 horas en algunos animales, lo que demuestra que el aceturato de diminazeno no tuvo efecto protector (Tuntasuvan *et al.*, 2003).

En contraste, con tres aplicaciones de aceturato de diminazeno, a dosis de 7 mg/kg en intervalos de 7 días, administrados a caballos con manifestaciones clínicas de “derrengadera” en Brasil, se observó una eficacia curativa en el 80% de los animales, y no se observó toxicidad aparente. Uno de los animales con recidiva recibió nuevamente

tratamiento a los 90 días, y se concluyó que el protocolo aplicado fue eficaz en la curación de la enfermedad, al ser evaluados los animales afectados como negativos, pasado un año de acontecido el proceso (Da Silva *et al.*, 2009e).

Este tripanocida se ha citado como no curativo o demasiado tóxico en camélidos, proponiéndose una dosificación de 3,5-5 mg/kg, rango inferior al descrito anteriormente. Aunque no se recomienda su uso en dromedarios, y se ha citado toxicidad dentro del rango propuesto, se usa de forma amplia en camellos bactrianos en Asia, obteniéndose resultados satisfactorios a dosis de hasta 5 mg/kg (Wernery y Kaaden, 2002).

Un protocolo de tratamiento con aceturato de diminazeno en ratas infestadas por *T. evansi*, que consistió en administración de la droga cada 24 horas a dosis de 3.5 mg/kg y 7 mg/kg durante 5 días consecutivos, obtuvo un 100% de efectividad, aunque no se realizó PCR para confirmar los resultados negativos obtenidos a través de frotis con sangre periférica (Da Silva *et al.*, 2008c). El mismo protocolo terapéutico aplicado en gatos, pero a dosis de 3,5 mg/kg, mostró una eficacia del 85,7% en el control de la tripanosomosis por *T. evansi*, sin detectarse signos de toxicidad de acuerdo a la normalidad mostrada en los parámetros hepáticos y renales (Da Silva *et al.*, 2009f).

Como alternativa para el tratamiento de la surra, la combinación diminazeno con selenito de sodio produjo un incremento de la longevidad en ratas infestadas, limitó la reducción del hematocrito, incrementó el número de leucocitos y redujo la peroxidación lipídica (Tonin *et al.*, 2011).

Se ha sugerido, por un lado, que la eficacia en la curación de la tripanosomosis por *T. evansi* utilizando aceturato de diminazeno, depende de la concentración a la que se administra la droga así como del número de dosis aplicadas, siendo citadas como inefectivas las dosis únicas (Da Silva *et al.*, 2009f), a pesar de que las indicaciones del fabricante (Berenil<sup>®</sup>) aseguran una cura completa con una dosis única.

Por otro lado se han sugerido como causas que expliquen las recidivas tras el tratamiento, la imposibilidad del fármaco para traspasar la barrera hematoencefálica si el tratamiento es tardío o, en el caso de inefectividad tras la aplicación de tratamientos

tempranos, posibles mecanismos de resistencia que manifieste el parásito frente a la droga (Da Silva *et al.*, 2009f).

De acuerdo con las indicaciones del fabricante (Berenil<sup>®</sup>), en infestaciones por cepas resistentes, la dosis podría incrementarse hasta 8 mg/kg de peso corporal, pero sin exceder una dosis total de 4 gramos por animal. Entre distintas cepas de *T. evansi* de diferentes procedencias geográficas, en las que se estudió la sensibilidad a las drogas tripanocidas actualmente disponibles, se observó la menor sensibilidad en cepas del sudeste asiático, lo que podría deberse a sobreexposición del tratamiento con diminazeno en los animales hospedadores afectados por dichas cepas (Zhang *et al.*, 1993; Gillingwater *et al.*, 2007).

Se ha descrito incluso, resistencia cruzada entre drogas utilizadas en tratamiento de la surra, a pesar de no existir relación química entre las mismas, como es el caso de algunas cepas resistentes a diminazeno que también mostraron resistencia a melarsamina (Zhang *et al.*, 1993).

A nivel molecular, se ha citado la expresión génica diferencial de los genes *TevAT1* y *TeDR40* en relación con la resistencia a diminazeno mostrada por *T. evansi* (Witola *et al.*, 2004, 2005).

Dentro de la innovación terapéutica, tras resultados obtenidos *in vitro*, se ha confirmado posteriormente *in vivo* en un modelo murino, la efectividad de nuevas diamidinas en la quimioterapia frente a la infestación por *T. evansi*. Tres nuevas diamidinas (DB 75, DB 867 y DB 1192) mostraron efectividad superior a la mostrada por las drogas estándar diminazeno, suramina y quinapiramina y fueron seleccionadas como potenciales drogas candidatas contra la tripanosomosis por *T. evansi* para un modelo en grandes animales. Además, se tomaron como criterios de elección la probabilidad de efectividad contra poblaciones resistentes, baja toxicidad, ausencia de toxicidad en el modelo murino a la droga, la evaluación de los costes y producción a gran escala, y por último, descartando posibles drogas candidatas para terapia en humanos, para así evitar que se produzcan potenciales resistencias (Gillingwater *et al.*, 2009, 2010).

Una de las consideraciones a tener en cuenta, con respecto a salud pública es el periodo de espera para los productos de origen animal en las especies de abasto tratadas con quimioterápicos frente a la surra. A este respecto, de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Berenil<sup>®</sup>), el periodo de retirada para carne y para leche son respectivamente, 20 y 3 días. No obstante, de acuerdo a estudios de persistencia de residuos, sería recomendable un periodo de retirada tanto para leche como para carne superior a los 21 días (Desquesnes, 2004).

Se ha citado el uso eficaz del aceturato de diminazeno en medicina humana, empleado frente a infestación por *T. brucei gambiense* y *T.b. rhodesiense* a dosis de 5 mg/kg/día durante 3 días por vía intramuscular, aunque a veces origina neuropatía periférica, fiebre, náuseas, vómitos y parálisis temporal (Anadón y Martínez-Larrañaga, 2008).

### **7.1.2. Suramina sódica**

La suramina es un derivado del naftaleno que en el tratamiento frente a tripanosomosis se une a algunas proteínas séricas y se introduce en los tripanosomas por endocitosis, unida a lipoproteínas de baja densidad. De esta forma, y en primer lugar, se produce una interferencia con el metabolismo de los tripanosomas, bloqueando la llegada de colesterol a los parásitos, el cual es necesario para su crecimiento. En segundo lugar, la suramina una vez que accede al tripanosoma, produce una inhibición en varias enzimas que encuentra en su camino, desde el líquido extracelular hasta los lisosomas, orgánulos donde mayoritariamente se produce su acúmulo. En el caso de las enzimas glicolíticas de los tripanosomas, se ven inhibidas por la acción de la suramina como consecuencia de la alta carga positiva que presentan, a diferencia de las enzimas glicolíticas del hospedador que son menos positivas, y por tanto insensibles a la acción de la droga (Nok, 2003). La suramina no es capaz de cruzar de forma significativa la barrera hematoencefálica o acceder al líquido cefalorraquídeo (Sanderson *et al.*, 2007).

La suramina sódica no aparece registrada en España como medicamento de uso en medicina humana ni en medicina veterinaria (AEMPS, 2011). En medicina humana la suramina se emplea en el tratamiento de la enfermedad del sueño y también de la oncocercosis (OMS, 1996). Además de su empleo en el tratamiento de estas

enfermedades parasitarias en pacientes humanos, recientemente ha sido utilizada en ensayos para tratar otras enfermedades, incluyendo muchos tipos de cáncer (McGeary *et al.*, 2008), y se le han atribuido acciones protectoras sobre tejidos y efecto antifibrótico (Liu y Zhuang, 2011). En noviembre de 2002 se produjo un acuerdo entre Bayer HealthCare y la OMS para proporcionar el producto Germanin<sup>®</sup> (suramina) sin cargo, por un período inicial de cinco años, para la lucha frente a la enfermedad del sueño (OMS, 2007).

Desde que fue introducida en 1921, la suramina (Naganol<sup>®</sup> y Germanin<sup>®</sup>, Bayer) fue la principal droga utilizada para la terapia de la infestación por *T. evansi* en los animales, pero el uso masivo en muchas partes del mundo ha conducido a la aparición de poblaciones de *T. evansi* de distintos orígenes geográficos con resistencia a esta droga (Gillingwater *et al.*, 2007; Gutiérrez *et al.*, 2008). La producción de Naganol<sup>®</sup> fue interrumpida por el laboratorio Bayer, en Leverkusen, Alemania (Wernery y Kaaden, 2002).

En contraste con el comportamiento de otras drogas, la adquisición de resistencia a la suramina no confería patrones de resistencia cruzada *in vivo* frente a diminazeno y melarsamina (Zhang *et al.*, 1993). Algunas veces se asocia suramina y quinapiramina en el tratamiento de la surra (Desquesnes, 2004).

En una evaluación de la actividad *in vitro* de las drogas actualmente utilizadas frente a la surra, se observó el mayor valor de concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) para la suramina. Por otro lado, en una evaluación de la toxicidad preliminar *in vivo* en ratones, se observó que la suramina a una dosis acumulativa a partir de 50 mg/kg presenta toxicidad, aunque no es letal (Gillingwater *et al.*, 2010). En una evaluación *in vivo* en ratones inoculados con *T. evansi*, la suramina a una dosis de 1 mg/kg fue capaz de conseguir la curación (Gillingwater *et al.*, 2009).

Se ha citado su empleo en camellos y caballos a una dosis de 7-10 gramos por animal, administrada por vía intravenosa, con carácter terapéutico y profiláctico (Holmes *et al.*, 2004). A pesar de que la efectividad de esta droga ha decrecido en algunas áreas debido a resistencias, todavía se emplea Naganol<sup>®</sup> en camellos a una dosis de 10-12 mg/kg por

inyección intravenosa lenta, evitando su extravasación, que podría producir flebitis (Wernery y Kaaden, 2002).

El uso profiláctico en camellos, en los que previene entre 6 y 12 semanas, se debe a la lenta eliminación del cuerpo, y depende de la dosis empleada y del grado de cambio que muestren los tripanosomas (Wernery y Kaaden, 2002).

En caballos infestados por *T. evansi* se ha descrito el tratamiento con una solución acuosa del 10% de suramina (Naganol<sup>®</sup>, Bayer), empleándose en tres ocasiones una dosis de 7 mg/kg cada 7 días por vía intravenosa, tras haber fallado la terapia con diminazeno (Monzón *et al.*, 1995). En cambio, en ovejas infestadas por *T. evansi* se administró suramina intravenosa a dosis de 10 mg/kg sin éxito en la eliminación de los parásitos, por lo cual se empleó un segundo y definitivo tratamiento tripanocida, esta vez con sulfato de quinapiramina a dosis de 5 mg/kg por inyección intramuscular (Onah *et al.*, 1999).

En cuatro osos negros del Himalaya (*Selenarctos thibethanus*), una especie en la que recientemente se informó la primera infestación natural por *T. evansi*, se realizó tratamiento de forma eficaz con suramina sódica dos veces y con casi el doble de la dosis recomendada para otras especies, sin observarse efectos adversos (Muhammad *et al.*, 2007). En otro caso atípico de infestación por *T. evansi* padecida por un paciente humano, tras comprobarse ausencia de parásitos en líquido cefalorraquídeo, se decidió el tratamiento con 1 gramo de suramina administrada semanalmente por vía intravenosa, durante 5 semanas (Joshi *et al.*, 2005; Powar *et al.*, 2006). La suramina, que es el fármaco de elección en la etapa temprana de la forma aguda de la enfermedad del sueño en humanos cuando no existe afección del SNC, obtuvo un resultado satisfactorio frente a *T. evansi*, por lo que debe tomarse en consideración frente a otros casos de infestación por *T. evansi* en humanos, si ocurrieran (Joshi *et al.*, 2006).

### **7.1.3. Derivados de la acridina**

La quinapiramina es un colorante de origen sintético, de color amarillo, derivado de la acridina, que se empleó durante la Segunda Guerra Mundial como antipalúdico, y

además presenta actividad frente a tenias (Sumano López y Ocampo Camberos, 2006). Este principio activo, que presenta actividad frente a *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma brucei* spp., fue retirado del mercado en 1974 debido a una amplia aparición de resistencias, pero fue reintroducido más tarde exclusivamente para el tratamiento de la surra (Zhang *et al.*, 1993).

Existen varias denominaciones comerciales del sulfato de quinapiramina para uso terapéutico: Trypacide sulphate<sup>®</sup> (May and Baker, Rhône-Merieux), Antrycide<sup>®</sup> (Alkaline Chemical Corp., India; Bella Trading Khartoum, Sudan), Noroquine<sup>®</sup> (Norbrook) y Quintrycide<sup>®</sup> (Gharda) (Mehlhorn, 2001).

El sulfato de quinapiramina (Trypacide sulphate<sup>®</sup>, Antrycide<sup>®</sup>) es usado en la quimioterapia de infestaciones por *T. evansi*, mientras que la mezcla de sulfato y cloruro de quinapiramina (3:2 w/w) (Trypacide Prosalt<sup>®</sup>, Antrycide Prosalt<sup>®</sup>) es usado principalmente como quimioprofiláctico. Este principio activo principalmente se emplea en caballos y en camellos, aunque también se utiliza en cerdos y perros, y se indican dosis de 3-5 mg/kg, administradas por inyección subcutánea (Desquesnes, 2004; Holmes *et al.*, 2004). La mezcla de sulfato y cloruro de quinapiramina presenta en camellos un efecto profiláctico de 4 a 6 meses (Wernery y Kaaden, 2002). En ovejas infestadas por *T. evansi* se ha descrito el empleo de quinapiramina de forma efectiva a una dosis de 5 mg/kg, por inyección intramuscular profunda (Onah *et al.*, 1999).

Un estudio de toxicidad *in vivo* en ratones infestados por *T. evansi* mostró que la administración de quinapiramina a una dosis de 5 mg/kg fue letal (Gillingwater *et al.*, 2010). La quinapiramina administrada a ratones infestados por *T. evansi* a dosis de 1 mg/kg durante 4 días consecutivos obtuvo una gran eficacia, con la curación de todos los animales tratados, reduciéndose el porcentaje de efectividad al disminuir la dosis por debajo de este valor (Gillingwater *et al.*, 2009).

La quinapiramina puede producir reacciones locales y sistémicas tales como salivación, temblores, diarrea y colapso (Mehlhorn, 2001). Para evitar reacciones alérgicas, se ha tratado a caballos afectados por *T. evansi* con maleato de clorfenamina media hora antes de la aplicación de la terapia tripanocida basada en sulfato de quinapiramina; además se

ha sugerido el suplemento con antioxidantes en el régimen terapéutico establecido para contrarrestar el estrés oxidativo (Ranjithkumar *et al.*, 2011).

Se han observado patrones de sensibilidad distintos a quinapiramina *in vivo* e *in vitro* entre cepas de distintos orígenes geográficos (Zhang *et al.* 1993; Gillingwater *et al.*, 2007). Además se ha advertido que subclones con resistencia inducida *in vivo* a aceturato de diminaceno, melarsamina y suramina llegaron a ser más sensibles a quinapiramina que sus clones parentales (Zhang *et al.*, 1993). La observación de patrones homogéneos en el cariotipo entre cepas de *T. evansi* que han sufrido a nivel de campo una alta presión terapéutica con quinapiramina, podría conducir a la existencia de tripanosomas resistentes a esta droga (El Rayah y El Malik, 2006).

#### 7.1.4. Arsenicales

Los arsenicales tienen alta afinidad por los grupos sulfhidrilo, y se cree que su mecanismo de acción se produce por bloqueo del metabolismo energético del parásito como consecuencia de una inhibición de la glucólisis (Anadón y Matínez-Larrañaga, 2008).

El dihidrocloruro de melarsamina es el único arsenical utilizado para el tratamiento curativo de la surra y se encuentra bajo la denominación comercial Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial). No se encuentra autorizado como medicamento veterinario para esta enfermedad en España, pero sí para la terapia curativa de adultos de *Dirofilaria immitis* en perros, bajo el nombre comercial Immiticide<sup>®</sup> (Merial) (AEMPS, 2011). En humanos que padecen la fase tardía de la enfermedad del sueño se utiliza melarsoprol (Nok, 2003), un arsenical distinto al utilizado en medicina veterinaria. Debido a la posibilidad de refugio de *T. evansi* en focos extravasculares tales como el líquido cefalorraquídeo, se ha citado al clorhidrato de melarsamina como el tripanocida más conveniente a utilizar, siendo el único capaz de traspasar esta barrera a dosis altas de 0,5-1 mg/kg (Desquesnes *et al.*, 2009b).

De acuerdo con las indicaciones del fabricante, Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial) está indicado en camellos a una dosis de 0,25 mg/kg administrada de forma profunda en las tablas del

cuello, teniendo como respuesta una rápida actividad tripanocida que conduce a destrucción de los tripanosomas en pocas horas y presentando buena tolerancia en el animal, produciéndose en algunos casos una ligera hinchazón en la zona de inyección que remite en pocos días.



---

**Figura 12.** Cymelarsan<sup>®</sup> (Laboratorio Merial).

En caprinos infestados experimentalmente con *T. evansi*, y posteriormente tratados con Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial), se consiguió remisión de la parasitemia a dosis de 0,5 mg/kg y 0,625 mg/kg y se observaron recidivas a dosis de 0,3 mg/kg (Gutiérrez *et al.*, 2008). En vacas infestadas con *T. evansi* que fueron tratadas con Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial) la droga mostró efectividad en la curación a dosis de 0,5 mg/kg y 0,75 mg/kg (Payne *et al.*, 1994a, b).

Estudios en conejos infestados con *T. evansi* mostraron recidiva de la parasitemia cuando se realizó el tratamiento con Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial) a los 21 días tras la infestación, pero no se observó recurrencia en animales tratados a los 7 días después de la infestación (Biswas y Hunter, 1993). Wernery *et al.* (2001) trataron con Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial) a tres caballos con dosis únicas de 0,5 mg/kg para cada équido en los días 99, 104 y 106 tras la inoculación con *T. evansi* y observaron recidiva a los 76 días post-tratamiento en el caballo tratado más tardíamente.

El Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial), oficialmente registrado para quimioterapia en caballos, camellos y cabras, presentó una IC50 en el rango >0,1 a 2,8 ng/ml en varias cepas de *T. evansi* de distintos orígenes geográficos en las que se estudió la sensibilidad *in vitro* (Gillingwater *et al.*, 2007). En un modelo murino, este principio activo demostró la mayor eficacia terapéutica entre las drogas actualmente disponibles en el mercado, pero como desventaja presenta el mayor coste (aproximadamente 7 € por camello) y su disponibilidad está limitada a ciertas zonas del mundo como Oriente Medio y África (Gillingwater *et al.*, 2009). Este fármaco se considera no citotóxico, al observarse *in vitro* una IC50 mayor de 150 nM sobre mioblastos de rata, y en cuanto a toxicidad *in vivo* sobre ratones se observó una dosis letal de 20 mg/kg vía intraperitoneal (Gillingwater *et al.*, 2010). En un ensayo de toxicidad en caprino con dosis de 15 mg/kg administradas por vía subcutánea se produjo una hinchazón en el punto de inoculación, pero no se observó reacción tóxica sistémica (Gutiérrez *et al.*, 2008).

En cepas de *T. evansi* resistentes a melarsamina de forma inducida *in vivo*, se han observado además patrones de resistencia cruzada frente a diminazeno y pentamidina. En el caso de cepas en las que se indujo resistencia a diminazeno se observó variabilidad en la sensibilidad a melarsamina (Zhang *et al.*, 1993).

De acuerdo con el fabricante de Cymelarsan<sup>®</sup> (Merial) se trata de un fármaco seguro en hembras gestantes y que presenta un periodo de retirada 14 días, tanto para carne como para leche. No obstante, se ha observado en camellos que la cantidad de arsénico en suero todavía no ha retornado a niveles normales a los 42 días post-tratamiento, y se ha descrito que las cabras presentan mayor susceptibilidad a acumular arsénico que los camellos tratados con melarsamina (Youssif *et al.*, 2008). Aunque el efecto residual de esta droga en el camello todavía no se conoce totalmente, esta especie aparentemente ha permanecido libre de *T. evansi* durante 90 días tras el tratamiento (Wernery y Kaaden, 2002).

## **7.2. Medidas preventivas frente a la surra**

### **7.2.1. Inmunización frente a *Trypanosoma evansi***

Frente a la surra no existen actualmente vacunas disponibles (OIE, 2010). Tanto en el caso de *T. evansi* como en los de otros tripanosomas africanos, la existencia de una vacuna ha sido impedida por las características de la cubierta que presentan estos organismos, conformada por glicoproteínas variables de superficie, lo que les permite evadir la respuesta inmunológica del hospedador. De forma previsible, esto dificultará durante muchos años el desarrollo de esta medida como alternativa profiláctica potencial (Antoine-Moussiaux *et al.*, 2009).

La inmunización de mamíferos contra *T. evansi* ha sido obtenida por infestación seguida de tratamiento, pero se trata de una protección generalmente efectiva sólo contra infestaciones homólogas con la misma variante y cuando la cantidad de parásitos inoculados es pequeña (Desquesnes, 2004).

Se han empleado otras estrategias innovadoras en la búsqueda de vacunas, no centradas precisamente en la glicoproteína de superficie. Así, se han indicado como prometedoras las inmunizaciones contra los antígenos de la bolsa flagelar, y se ha citado también la inmunización contra la cisteína proteasa (Desquesnes, 2004). Por otro lado, frente a *T. brucei* se han realizado estudios preliminares de las propiedades inmunogénicas de la proteína P15 asociada a los microtúbulos del parásito (Rasooly y Balaban, 2004). De la misma forma, se ha demostrado experimentalmente que otros componentes del citoesqueleto, tales como la actina recombinante y la beta-tubulina recombinante de *T. evansi*, son potenciales candidatos para el desarrollo de una vacuna para prevenir tanto la surra como las tripanosomosis animales causadas por *T. equiperdum* y *T. brucei* (Li *et al.*, 2007, 2009).

### **7.2.2. Inmunización frente a vectores transmisores de *Trypanosoma evansi***

Desde otro punto de vista y basada en un nuevo concepto, se ha enfocado la inmunización de los mamíferos hospedadores dirigida contra los parásitos hematófagos,

partiendo para ello de extractos de antígenos internos de los parásitos (Desquesnes, 2004).

Se ha investigado el efecto que produjo sobre la alimentación de ejemplares de *Stomoxys calcitrans* sobre conejos la inmunización previa de éstos con diferentes tejidos procedentes del díptero señalado. Se observó una mortalidad de las moscas de los establos superior a la observada en los grupos control, y también se produjo una disminución de la viabilidad de los huevos (Schlein y Lewis, 1976; Webster *et al.*, 1992).

En estudios con ejemplares de *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans*, que se alimentaban sobre bovinos previamente inmunizados con antígenos procedentes de forma separada de los intestinos de estas dos especie pertenecientes a la subfamilia Stomoxynae, no se observaron diferencias en la mortalidad de dichos insectos, pero sí una disminución en la ovoposición con respecto al grupo control (Bautista *et al.*, 2004; 2007).

Recientemente se han investigado estrategias de control de las moscas de los establos y de las moscas de los cuernos, a través de la capacidad inmunógena que pueden producir ciertos antígenos contenidos en las glándulas salivares de estos insectos sobre los hospedadores (Cupp *et al.*, 2004; Ameri *et al.*, 2008; Cupp *et al.*, 2010).

En el caso de los tábanos, para su control se indica como estrategia probable a seguir el abordaje a través de la selección de animales resistentes de forma natural a estos insectos, o emplear la ingeniería genética en animales que no expresen esta resistencia de forma natural. Como pre-requisito para continuar este tipo de investigaciones sobre tábanos, se necesita desarrollar métodos estandarizados para la cría de estos insectos en condiciones de laboratorio (Desquesnes, 2004).

### **7.2.3. “Quimioterapia Curativa” frente a “Quimioterapia Preventiva”**

Con las herramientas actualmente disponibles para luchar y controlar la enfermedad, si el diagnóstico y el tratamiento de la surra son perfectamente efectivos, no compensa

adoptar una estrategia preventiva sobre una estrategia basada en tratamientos curativos durante todo el año. Sin embargo, si existen largos periodos de retraso o ineffectividad en el diagnóstico y el tratamiento, así como si se producen incrementos en el riesgo de la infestación, el bienestar animal exige adoptar una estrategia basada en quimioterapia preventiva (Seidl *et al.*, 2001).

Cuando ocurre un brote epizootico de tripanosomosis debe emplearse quimioprofilaxis en los animales susceptible, como por ejemplo tratamiento con quinapiramina (Desquesnes, 2004). En el Pantanal Brasileño, donde existe una población de 49000 caballos ligados a labores ganaderas, se estiman pérdidas anuales en torno al 13 % debido a *T. evansi* si no se toman medidas de control. Dentro de los métodos de control se muestra como más eficaz desde el punto de vista de reducción de la mortalidad el tratamiento preventivo y le siguen en orden decreciente de eficacia en segundo lugar una estrategia de tratamientos curativos durante todo el año, y por último una estrategia de tratamiento curativo estacional (Seidl *et al.*, 2001). Desde el punto de vista económico se propone el tratamiento curativo durante todo el año (Seidl *et al.*, 1998).

Mediante modelos para *T. evansi* en los que se evaluaron varias estrategias encaminadas al control de la enfermedad en Filipinas, se concluyó que empleando una droga eficaz y tratando todos los animales dos veces al año o monitorizando mensualmente con tratamiento de los animales enfermos se produce un beneficio sustancial sobre la estrategia consistente en chequeo anual y tratamiento de seropositivos. Se recomienda el tratamiento dirigido a los animales enfermos, entre las dos opciones citadas que añaden beneficios, debido a que se produce una reducción de los costes y de la mano de obra necesaria, mejor actividad tripanocida frente a la disminución de la eficacia, y por último reducción del riesgo de la selección de resistencia a los medicamentos. Como desventaja, la opción recomendada produce una reducción de la prevalencia a más largo plazo (Dobson *et al.*, 2009).

#### **7.2.4. Vigilancia fronteriza en áreas libres de la enfermedad**

En zonas libres de surra donde existe la presencia de tabánidos de forma estacional y grandes poblaciones de hospedadores reservorios potenciales, la introducción de *T.*

*evansi* daría lugar a una situación con grandes posibilidades de que el área llegara a ser endémica. De acuerdo a que el movimiento de ganado es el factor clave para la distribución de *T. evansi*, existe la necesidad de constante vigilancia en áreas no endémicas de surra que son fronterizas con zonas endémicas (Reid, 2002). Se establecen diferencias entre distintas zonas del mundo, en cuanto al valor en la epidemiología de ciertas especies como puede ser el ganado vacuno, que en Latinoamérica actúa como fondo de saco epidemiológico más que como reservorio, a diferencia de la situación que acontece en Asia, pero no por ello se debe relajar la vigilancia (Desquesnes, 2004).

Los animales de nuevo ingreso en granjas o países, deben ser tratados utilizando tripanocidas que eliminen totalmente el parásito, incluso si la granja que recibe dicho animales se encuentra infestada por *T. evansi*, para así evitar la introducción de nuevas cepas genéticamente y fenotípicamente diferentes (Desquesnes, 2004).

#### **7.2.5. Educación en prevención de la enfermedad**

El gobierno de Filipinas ha aplicado un programa de control denominado MUSCA (Mindanao Unified Surra Control Approach) para reducir la incidencia de la enfermedad, evitar pérdidas económicas y prevenir la expansión de la enfermedad a otras provincias. Aparte de emplearse como herramienta fundamental el tratamiento con diminazeno, también se ha enfocado el programa a la realización de una labor educativa sobre todos los agentes implicados, desde ganaderos a laboratorios, observándose una reducción del daño producido por la enfermedad (Dobson *et al.*, 2009).

Dentro de cada colectivo de animales se deben extremar las precauciones para limitar la transmisión iatrogénica de organismos infecciosos e infestantes tales como *T. evansi*, dado que se contempla la posibilidad de contagio en prácticas zootécnicas y veterinarias donde se comparta material sin las adecuadas medidas higiénicas (Ngeranwa y Kilalo, 1994; Reid, 2002; Fowler, 2010). Se deben tomar precauciones mediante medidas sencillas como es emplear agujas de un solo uso (Desquesnes, 2004).

Para evitar la transmisión por vía oral de *T. evansi* a perros y gatos, se debe evitar que accedan a despojos y carne de animales potencialmente infestados. Así, en Sudamérica

cuando existe la posibilidad de contagio por mordedura de vampiros, se propone como medida preventiva guardar el ganado en refugios durante la noche (Desquesnes, 2004).

El manejo ganadero y el diseño de la explotación pueden influir en el control de la enfermedad. Así, el empleo de telas mosquiteras puede evitar las picaduras de insectos vectores. Para algunas especies de tábanos que evitan entrar en lugares cerrados, podría ser necesario tener un corral techado. La limpieza y no acúmulo de estiércol y materia orgánica en descomposición facilitan el control de *Stomoxys* spp. En cuanto al pastoreo del ganado, se reduce la exposición a tábanos en pastizales abiertos, ya que estos insectos tienen preferencia por la vegetación espesa, así como también se reduce el riesgo practicando el movimiento de animales en base a la actividad diaria o estacional de los tábanos (Hall y Wall, 2004).

## **7.2.6. Control sobre los vectores transmisores de *Trypanosoma evansi***

### **7.2.6.1. Control sobre *Desmodus rotundus***

Para reducir el movimiento de *T. evansi* entre hospedadores y murciélagos vampiros se justifica el control de estos últimos animales, considerados tanto vectores como reservorios del parásito (Desquesnes, 2004).

Se han citado métodos de control de murciélagos descritos en la década de los setenta del pasado siglo, encuadrados en el marco de la prevención de la rabia, pero también de utilidad en la prevención de la transmisión de *T. evansi*. El control se aborda desde la perspectiva de la intoxicación de los vampiros con un anticoagulante, la difacinona, aplicado en mezcla con vaselina sobre el dorso de ejemplares capturados con redes y que posteriormente son liberados, contaminando así a sus congéneres (Linhart *et al.*, 1972). Otra alternativa consiste en el tratamiento del ganado con 1 mg/kg de difacinona vía intraruminal, lo que es inocuo para el vacuno, pero supone una dosis letal para los vampiros que muerden a estos animales en las 72 horas posteriores al tratamiento (Thompson *et al.*, 1972).

### 7.2.6.2. Control sobre insectos vectores de *Trypanosoma evansi*

#### 7.2.6.2.1. Métodos no químicos de control.

Se han realizado ensayos limitados de esterilización de *Stomoxys calcitrans* para posterior liberación de dichos ejemplares en el campo, pero esta técnica no se ha empleado en tábanos debido a la dificultad de cría en condiciones de laboratorio y la gran variedad de especies dentro de este grupo (Hall y Wall, 2004).

Existen distintos tipos de trampas que a través de estímulos visuales y olfatorios (dióxido de carbono, octenol, amoníaco) sirven para capturar tábanos, pero su uso está más orientado a la monitorización que al control. No obstante se podría reducir la actividad hematófaga de estos insectos si las trampas se concentran en lugares donde el ganado se reúne, como pueden ser puntos de agua o en los corrales (Hall y Wall, 2004). Para capturar tábanos se han utilizado varios tipos de trampas: Manitoba, Vavoua, Malaise, Nzi y Tetra (Desquesnes, 2004).



**Figura 13.** Trampa Nzi. (A) Vista frontal. (B) Vista lateral.

Para capturar *Stomoxys* spp. existen trampas pegajosas, desarrolladas para monitorización más que para el control. Existen trampas electrocutoras desarrolladas comercialmente, más efectivas a largo plazo que las anteriores y sin los riesgos

asociados a los insecticidas (Hall y Wall, 2004). Para capturar *Stomoxys* spp. la trampa más efectiva es del tipo Vavoua (Desquesnes, 2004).

A pesar de que existe un amplio abanico de enfermedades infecciosas, parásitos y predadores que afectan a los tábanos, como ciertos géneros de avispas (*Stictia*, *Rubrica* y *Bembix*), el control biológico desde esta perspectiva no ha recibido demasiada atención (Hall y Wall, 2004). A este respecto, se puede considerar colocar acúmulos de arena en los pastos que no son de naturaleza arenosa, para estimular así que habiten avispas de la arena las cuales son depredadoras de tábanos (Desquesnes, 2004).

En el control biológico de *Stomoxys* spp. se han conseguido mayores éxitos, pero no los suficientes para aplicarlo fuera de una situación experimental (Hall y Wall, 2004). Se han descrito dos especies de himenópteros pertenecientes a la familia *Pteromalidae*, concretamente *Spalangia cameroni* y *Muscidifurax raptor*, como parasitoides de pupas de *Stomoxys calcitrans* (Coronado *et al.*, 2006). Sin embargo, en otro estudio donde se consideró el uso de parasitoides como enemigos naturales de moscas de los establos y domésticas dentro de un manejo integrado de estas plagas, se realizó liberación de *S. cameroni* y se observó supresión en la población de mosca doméstica, mientras que no se detectó efecto sobre *Stomoxys calcitrans* (Skovgård y Nachman, 2004).

En cuanto al suministro de agua, este debe ser adecuado tanto por el bienestar de los animales como también, desde el punto de vista del control biológico, por el fomento de la sedentarización de aves como garcetas que se puedan alimentar de tábanos. A este respecto, las aves de corral que cohabitan con el ganado ayudan a disminuir la carga de este insecto (Desquesnes, 2004).

Se han descrito varias alteraciones de los hábitats de los vectores como medidas de control de los mismos, como la deforestación o drenaje de pantanos en el caso de los tábanos (Hall y Wall, 2004). No obstante, es conveniente realizar un estudio ecológico de las especies de tábanos presentes en una zona particular antes de tomar medidas encaminadas al control de estos insectos por alteración del hábitat (Desquesnes, 2004). En cuanto a alteración del hábitat, para restringir las zonas de cría de *Stomoxys* spp. se ha propuesto la reducción de los acúmulos de estiércol y plantas en descomposición

(Hall y Wall, 2004), aunque es una práctica difícil de cumplir en las explotaciones ganaderas (Desquesnes, 2004).

Quemar hojas y ramas dentro de un bidón en las zonas de pastoreo, se ha citado como método de control, ya que el humo ahuyenta a los tábanos, aunque no a todas las especies, ya que algunas como las del género *Chrysops* son atraídas por este procedimiento (Desquesnes, 2004).

Otra estrategia de prevención de la transmisión de *T. evansi* por tábanos es la separación entre animales infestados y animales susceptibles. Se han descrito movimientos de tábanos para completar su alimentación entre caballos separados por una distancia de 25 metros, pero no se observaron cuando la separación era de 50 metros. Se recomienda una separación de 200 metros, lo que supone 4 veces la distancia a la que no se observó movimiento (Barros y Foil, 2007)

#### **7.2.6.2.2. Métodos químicos de control**

En cuanto al empleo de métodos químicos de control, se ha propuesto la aplicación de insecticidas en el medio que rodea a los animales, tanto para luchar contra los insectos adultos como frente a los estadios larvarios. Así, en el control frente a *Stomoxys* spp. se pueden emplear larvicidas incluyendo reguladores del crecimiento de los insectos sobre la cama de los animales, la paja húmeda y sobre el estiércol, además de uso de spray residual en las áreas de descanso de los insectos adultos, como son las paredes, tomando las medidas necesarias para evitar la inducción de resistencias a los mismos. Resulta más complicado realizar un tratamiento específico de este tipo frente a los tábanos (Hall y Wall, 2004).

Las aplicaciones de insecticidas de forma indiscriminada a gran escala en el medio no se realizan debido a la reinvasión, costes e impacto medioambiental (Hall y Wall, 2004).

Se pueden emplear insecticidas sobre los animales aplicados de forma tópica *spot-on*, *pour-on* o por inmersión, utilizándose generalmente organosfosforados o piretroides. Las lactonas macrocíclicas (ivermectina, doramectina, eprinomectina, selemectina y

moxidectina) tienen una eficacia relativamente limitada frente a moscas a dosis terapéuticas normales (Hall y Wall, 2004). Las aplicaciones insecticidas sobre los animales no se utilizan usualmente en zonas donde coinciden la estación lluviosa con la mayoría de los brotes de *T. evansi*, debido a la probabilidad de que los tratamientos puedan ser lavados (Seidl *et al.*, 2001). Una alternativa a los insecticidas aplicados tópicamente son el uso de crotales o collares impregnados en insecticidas (Hall y Wall, 2004). Sólo las presentaciones en spray y *pour-on* parecen adecuadas para el control de los tábanos, aunque el coste de la segunda medida supone aproximadamente el doble por animal tratado (Desquesnes, 2004).

Se recomienda una fumigación cuidadosa en las zonas corporales más vulnerables a los ataques de los tábanos como son las extremidades, cabeza y barriga, empleando una asociación de deltametrina y butóxido de piperonilo (Butox<sup>®</sup> 50, 50ppm de ingrediente activo: 2 litros/caballo), evitando aplicar este tratamiento durante el pico de actividad de avispa de la arena (Desquesnes, 2004).

Dentro de un colectivo de animales, la carga de tábanos varía enormemente pero de forma persistente de un animal a otro, por lo que se recomienda tratar de forma preferente con insecticidas a estos animales que producen más atracción. Se ha sugerido para reducir los costes que supone el control químico de insectos hematófagos tratar a una parte del rebaño, entre el 5% y 20%, dando prioridad a los animales más susceptibles (Desquesnes, 2004).

Se contempla la aplicación de repelentes sobre los animales a través de distintas formulaciones como spray, pegamentos aplicadores de cera y etiquetas impregnadas, y que incluyen distintos principios activos, entre ellos el más conocido la N, N-Dietilmeta-toluamida, conocida como DEET. Al igual que los insecticidas, su efectividad puede reducirse por la lluvia o por el movimiento de los animales entre la vegetación. En el uso de repelentes, insecticidas, o combinación de los mismos, se puede dar una situación delicada cuando se hace un mal uso de los mismos, pudiendo producir un efecto contrario al que se busca. Cuando se produce una efectividad parcial e irritación de las moscas como consecuencia de un mal uso, se permite que las moscas abandonen para completar su alimentación sobre otro hospedador, exacerbando así el problema de

la transmisión mecánica, muy al contrario de la situación ideal en la cual no hay alimentación o se completa toda en un solo hospedador (Hall y Wall, 2004).

#### IV. RELACIÓN DE ARTÍCULOS



**Comparación entre la técnica de centrifugación del microhematocrito (MHCT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *Trypanosoma evansi* en cabras inoculadas experimentalmente.**

Traducido y adaptado de:

Tejedor-Junco M. T., González-Martín M., **Rodríguez N. F.**,  
Corbera J.A., Gutiérrez C.

Small Ruminant Research, 96 (2011):70-72.



**Comparación entre la técnica de centrifugación del microhematocrito (MHCT) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar *Trypanosoma evansi* en cabras inoculadas experimentalmente.**

**Introducción**

*Trypanosoma evansi* es el tripanosoma patógeno animal africano de más amplia distribución, y afecta tanto a ganado doméstico como a fauna silvestre en Asia, África y Latinoamérica (Luckins y Dwinger, 2004). El parásito causa una enfermedad conocida como surra, y se transmite mecánicamente por picaduras de moscas tanto tse-tsé como otras, y también por mordeduras de murciélagos vampiro en América del Sur. Dicho protozoo afecta a numerosos animales domésticos, variando las principales especies hospedadoras de acuerdo con los continentes. Así búfalos, vacas, camellos y caballos son particularmente susceptibles, a pesar de que otros animales, dentro de los cuales se incluye fauna silvestre, también pueden ser infestados (OIE, 2009). Los pequeños ruminantes se crían de forma común en estrecho contacto con rebaños de camellos en muchas zonas desérticas y semi-desérticas en el mundo. Sin embargo, se cree comúnmente que las cabras, por ejemplo, son muy resistentes a la infestación, que la tripanosomosis caprina es sólo esporádica, y que la enfermedad en cabras tiene poca repercusión económica (Griffin, 1978). Esta opinión, sin embargo, se encuentra actualmente bajo una nueva revisión crítica (Smith y Sherman, 2009).

En las Islas Canarias, donde existe una población de camellos con alrededor 2.000 cabezas y un censo caprino de 363.000 cabezas (datos de 2007, censos ganaderos, Gobierno de Canarias, <http://www2.gobiernodecanarias.org/istac/estadisticas.html>), las cabras pueden compartir el mismo hábitat con los camellos en las zonas donde estos últimos habitan. En el Archipiélago Canario, la infestación por *Trypanosoma evansi* fue descrita por primera vez en 1997 en un dromedario (*Camelus dromedarius*) importado;

después de esto solo ha sido diagnosticada en la población de camellos (Gutiérrez *et al.*, 2000). Sin embargo, se sospecha del posible papel que las cabras podrían desempeñar en el mantenimiento de la enfermedad en las islas aunque hasta el momento no ha sido probado, ya que no han sido demostradas infestaciones naturales. En este sentido, las cabras infestadas podrían presentar dos importantes limitaciones: por una lado pueden presentar una parasitemia baja y/o alternante, y por otro lado no se presentan signos clínicos evidentes de infestación en esta especie, lo que ocurre de forma frecuente con muchas cepas de *T. evansi*, entre las cuales se encuentra la cepa canaria, utilizada en este estudio (Gutiérrez *et al.*, 2004b). La técnica de centrifugación del microhematocrito es una técnica sencilla que es fácil de realizar, incluso a nivel de campo, además de ser rápida y tener un costo mínimo; sin embargo, el método PCR requiere un laboratorio de biología molecular, es más caro y no siempre está disponible en países en vías de desarrollo.

Teniendo en cuenta que existe una variación considerable en la patogenicidad de diferentes cepas y la susceptibilidad de diferentes especies hospedadoras a la enfermedad (OIE, 2009), el propósito de este estudio fue evaluar la PCR con un cebador dirigido a una región repetitiva específica para el subgénero *Trypanozoon*, para amplificar un fragmento de 227 pb a partir del ADN genómico, en comparación con la técnica de centrifugación de microhematocrito (Woo, 1969), utilizando cabras inoculadas experimentalmente con la cepa canaria de *T. evansi*.

## **Material y métodos**

### Animales

Doce hembras adultas de caprino de Canarias fueron adquiridas para este experimento. Todos los animales fueron examinados usando los métodos de diagnóstico para *T. evansi* descritos a continuación, con resultados negativos. Ocho cabras fueron inoculadas experimentalmente por vía intravenosa con un mínimo de  $1 \times 10^5$  *T. evansi*. La cepa se obtuvo de un camello de Canarias con una infestación natural. Los restantes cuatro animales conformaron el grupo control. Las cabras fueron estabuladas en un área

experimental de la Facultad de Veterinaria con protección frente a moscas, y fueron mantenidas durante 6 meses.

### Muestras

Se tomaron muestras de sangre cada 2 semanas a partir de la vena yugular con tubos vacutainer<sup>®</sup> con EDTA como anticoagulante y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento.

### Evaluación serológica

Para evaluar la presencia de anticuerpos contra *T. evansi* se empleó el CATT/*T. evansi* (Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica), un método serológico validado y mencionado por la OIE (2009).

### Técnica de centrifugación del microhematocrito (MHCT)

La técnica de centrifugación del microhematocrito (MHCT) detecta la presencia de los tripanosomas móviles y se realizó mediante un tubo capilar por animal, centrifugando las muestras a 3000g. Las muestras de sangre se mantuvieron en refrigeración y la técnica fue realizada siempre dentro de las 2 h posteriores a la toma de sangre.

### Extracción de ADN y realización de la PCR

El ADN genómico fue extraído a partir de las muestras de sangre de las cabras, utilizando el sistema QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, GE) disponible comercialmente y el ADN purificado fue a continuación almacenado a -20 °C para su uso posterior.

La PCR fue realizada con un volumen de 25 µl de mezcla de reacción compuesto por tampón de reacción 10X (Bioline, Londres, Reino Unido), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 300 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) (Amersham Bioscience Europe, Barcelona, España), 100 ng de cebadores y 0,75U de Taq ADN-polimerasa (Bioline). Los ciclos de la PCR incluyeron un paso inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 30 s. La elongación se continuó a 72 °C durante 5 min. La cantidad de ADN molde agregado por reacción fue de 2 µl.

Para amplificar un fragmento de 227 pb a partir del ADN genómico se usaron los cebadores dirigidos a una región específica y repetitiva para el subgénero *Trypanozoon* (Wuyts *et al.*, 1994):

pMURTec.F, 5'-TGCAGACGACCTGACGCTACT-3';

pMURTec.R, 5'-CTCCTAGAAGCTTCGGTGTCTCCT-3'

Para la realización de la electroforesis se añadieron siete microlitros de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% (Roche Diagnostic, Barcelona, España) con un marcador de peso molecular con escalones de 100 pb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5mg/L) y el análisis de imagen se realizó con un transiluminador UV (Bio-Rad Gel Doc™ EQ).

Como control para *T. evansi* se utilizó una muestra de sangre de un camello clínicamente enfermo de surra y con resultados positivos a las pruebas serológicas y parasitológicas.

#### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente siguiendo las recomendaciones de Thrusfield (2007) respecto a la evaluación e interpretación de pruebas diagnósticas. Las variables se midieron como nominales y dicotómica (positivo / negativo).

## Resultados

Las cabras inoculadas mostraron un curso subclínico de la enfermedad. En dos cabras inoculadas se detectaron episodios de fiebre en la primera semana después de la inoculación y artritis a los 6 meses post-infestación. Todos los animales inoculados experimentalmente fueron positivos al CATT/*T. evansi* un mes después de la infestación y permanecieron positivos a lo largo del experimento, con un título final mínimo de 1:4. En todas las cabras inoculadas la parasitemia fue detectada a las 2 semanas después de la inoculación, y por tanto los animales se consideraron entonces infestados. En este grupo (infestados) se llevaron a cabo un total de 96 evaluaciones (8 cabras infestadas por 12 chequeos a cada una). El método de la PCR fue capaz de detectar la parasitemia en todas las muestras examinadas, mientras que a través del MHCT se detectó parasitemia en 89 muestras; esta técnica no pudo detectar tripanosomas en 7 muestras. En el grupo de control, se hicieron un total de 48 evaluaciones (4 cabras por 12 chequeos cada una), siendo todas las muestras negativas a ambas pruebas.

Considerando la PCR como método de referencia en este estudio, la comparación entre PCR y MHCT mostró los siguientes datos estadísticos: sensibilidad: 92,7%, especificidad: 100%, valor predictivo positivo: 1, valor predictivo negativo: 0,87.

## Discusión

A pesar de que no se han detectado infestaciones naturales por *T. evansi* en cabras que viven alrededor de las áreas infestadas en Canarias, este estudio demuestra que las cabras son susceptibles de adquirir la infestación. Además, parecen desarrollar la forma subclínica de la enfermedad, lo que coincide con los resultados de Jacquet *et al.* (1993) que lo demostraron utilizando una cepa de Mauritania, y por ello podrían actuar como reservorios inaparentes. En todas las cabras inoculadas se detectó la parasitemia a través de MHCT a las 2 semanas de la inoculación. Otros autores (Dargantes *et al.*, 2005a) han descrito la detección de *T. evansi* en cabras después de 2-5 días, tras la infestación experimental con un inóculo menor procedente de una cepa equina en Filipinas. Este

hecho podría explicarse por diferencias en la virulencia entre las cepas estudiadas o por la susceptibilidad con respecto a las cabras canarias.

En cuanto al diagnóstico, existe poca información disponible en la bibliografía sobre los métodos de diagnóstico de la tripanosomosis en cabras. Los métodos ELISA, IFI, o CATT/*T. evansi* han sido utilizados con éxito como pruebas serológicas (OIE, 2009); sin embargo, el examen parasitológico es necesario para confirmar la infestación. En este sentido, se asume comúnmente que los métodos parasitológicos empleados en otras especies animales también son válidos para las cabras, pero se necesitan más estudios al respecto que demuestren este supuesto. Por ejemplo, el pequeño tamaño de los eritrocitos de caprinos debe tenerse en cuenta para obtener valores válidos del hematocrito (Jain, 1986). Además la parasitemia es generalmente baja en cabras presentando infestaciones naturales (Gill, 1977), lo cual podría dar lugar a falsos negativos. Para solventar esto, nuestro grupo ha evaluado el método de la PCR utilizando una pareja de cebadores dirigidos a una región repetitiva específica para el subgénero *Trypanozoon* que amplifican un fragmento de 227 pb a partir del ADN genómico. Utilizando estos cebadores, la parasitemia fue detectada en todos los animales infestados durante el experimento. Es probable que la alta concentración de tripanosomas inoculados por vía intravenosa pueda haber contribuido a esta alta sensibilidad (100%). La técnica de concentración del microhematocrito, por otro lado, mostró interesantes datos estadísticos en comparación con los resultados de la PCR.

Desde el punto de vista epidemiológico, para cabras que muestran serología positiva nuestro grupo propondría el uso de MHCT como primer método parasitológico debido a su alta sensibilidad (casi el 93%) y, si es negativo, se podría utilizar la PCR como segundo método de elección. Esta propuesta podría estar apoyada por motivos de costo-efectividad, disponibilidad, consumo de tiempo y posibilidad de realizar la prueba a nivel de campo. Teniendo en cuenta que ningún método serológico muestra una sensibilidad del 100%, en las zonas endémicas y/o en rebaños infestados, las cabras serológicamente negativas también deben ser examinadas por métodos parasitológicos para descartar o confirmar la enfermedad.

**Estudio transversal sobre la prevalencia de  
la infestación por *Trypanosoma evansi*  
en rumiantes domésticos en  
un área endémica de las  
Islas Canarias (España).**

Traducido y adaptado de:

**Rodríguez N. F.**, Tejedor-Junco M.T.,  
Santana del Pino A., González-Martín M.,  
Gutiérrez C.

Enviado para su publicación (Preventive Veterinary Medicine)



**Estudio transversal sobre la prevalencia de  
la infestación por *Trypanosoma evansi*  
en rumiantes domésticos en  
un área endémica de las  
Islas Canarias (España).**

**Introducción**

*Trypanosoma evansi* es el tripanosoma patógeno animal africano de más amplia distribución, y afecta tanto a ganado doméstico como a fauna silvestre en Asia, África y Latinoamérica (Luckins y Dwyer, 2004). Este parásito causa una enfermedad conocida como surra, y se transmite de forma mecánica por moscas hematófagas. Afecta a un amplio número de animales domésticos, variando las principales especies hospedadoras de acuerdo con los continentes. Así búfalos, vacas, camellos y caballos son particularmente susceptibles, a pesar de que otros animales, incluyendo fauna silvestre, también pueden ser infestados (OIE, 2010).

*T. evansi* fue diagnosticado en las Islas Canarias por primera vez en el año 1997 en un dromedario que había sido importado desde Mauritania (Gutiérrez *et al.*, 2000). Se realizaron estudios de prevalencia en la población de camellos en el Archipiélago encontrándose valores que iban desde un 4,8% utilizando CATT/*T. evansi* a un 9% con IgG-ELISA (Gutiérrez *et al.*, 2010). Con la finalidad de evitar la diseminación de la enfermedad, el Gobierno de Canarias estableció un plan de control en el cual se incluyó la inmovilización y el tratamiento (Cymelarsan<sup>®</sup>, Merial, Francia) de todos aquellos animales infestados. Este programa de control ha resultado parcialmente satisfactorio, ya que las islas de Tenerife, Lanzarote y Fuerteventura, en las que se demostró la infestación a finales de los años 90, actualmente se consideran libres de la enfermedad. Sin embargo, este programa no ha funcionado en algunas zonas de la isla de Gran Canaria, donde existe una pequeña área que aún sigue afectada.

Así, animales previamente infestados han aparecido re-infestados varios meses después de practicarse el tratamiento, e incluso han sido detectados nuevos casos. Se ha demostrado que estas medidas no fueron suficientes en esas áreas al observarse la aparición de brotes en Francia (Desquesnes *et al.*, 2008) y territorio peninsular español (Tamarit *et al.*, 2010), producidos pocos meses después de la introducción de camellos desde Gran Canaria.

El plan de control llevado a cabo contra *T. evansi* en las poblaciones de los camellos afectados consiste en primer lugar en el estudio a través de los métodos parasitológico (MHCT) y serológico (CATT/*T. evansi*) en cualquier animal que presenta signos clínicos sospechosos de tripanosomiasis. En segundo lugar, y debido a que sólo dos granjas de camellos parecen seguir estando afectadas por *T. evansi*, en una de las explotaciones donde se mantienen estos animales domesticados se lleva a cabo la comprobación mensual de rutina y en la otra explotación donde los animales no están domados y por cuestiones de manejo y personal, la comprobación de rutina se lleva a cabo cada 3 meses. Todos los animales que presentan resultados positivos son tratados con melarsamina y separados del resto de animales en cada explotación. La prevención contra las moscas se lleva a cabo con insecticidas en spray o “pour on”.

Hasta el momento, la persistencia del parásito se podría explicar de dos maneras en estas condiciones particulares: falta de eficacia del tratamiento y consecuente recidiva de la parasitemia, o presencia de un reservorio en la zona afectada y posterior re-infestación. Para evaluar esta última posibilidad, nuestro grupo examinó roedores salvajes como posibles reservorios, concluyendo que no juegan un papel relevante en la transmisión de la enfermedad en las granjas afectadas (Rodríguez *et al.*, 2010). Otra posibilidad sería evaluar el estado de las especies ganaderas en Gran Canaria, isla donde se encuentran las granjas de camellos afectadas y que además ostenta el mayor censo de ganado en el Archipiélago Canario. Así, el propósito de este trabajo fue determinar la prevalencia de la infestación por *Trypanosoma evansi* en los rumiantes domésticos en la isla de Gran Canaria, con el fin de detectar posibles reservorios de *T. evansi* e implementar programas de control adicional.

## **Materiales y Métodos**

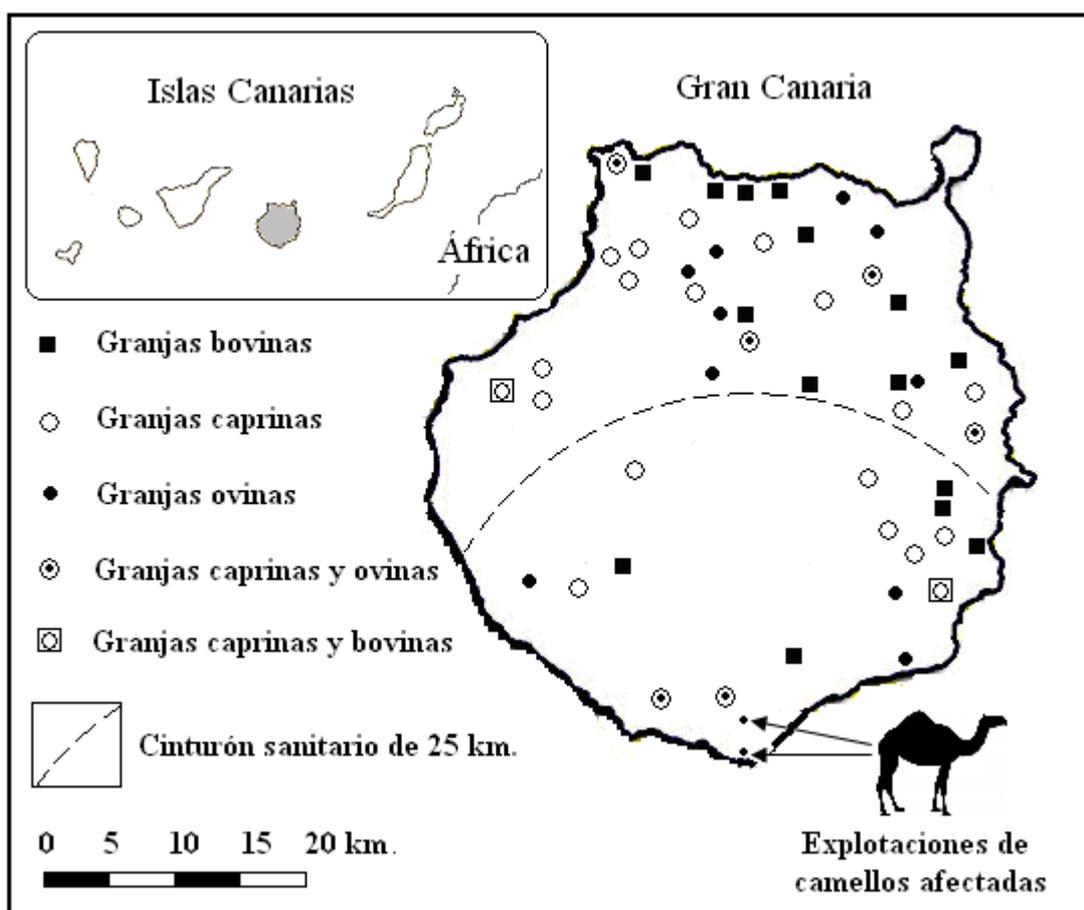
### Animales, áreas de muestreo y análisis de datos

De acuerdo a los datos de ganadería publicados en el año 2008 por el Gobierno de Canarias ([www.istac.org](http://www.istac.org)), Gran Canaria presenta un censo de rumiantes de 10373 vacas, 115085 cabras y 28141 ovejas. El conjunto de la población de rumiantes de la isla ha sido considerada como un único grupo relativamente pequeño, y se ha establecido un estudio monoetápico de acuerdo a la información oficial (censo del ganado; no hay información disponible sobre el número de rebaños por especies), el pequeño tamaño de la isla (1560 km<sup>2</sup>) y, finalmente por las similares estrategias de manejo en la mayoría de los rebaños de la isla.

Para el cálculo del tamaño muestral mínimo requerido y de la probabilidad de que los animales muestreados estuvieran infestados por *T. evansi* se utilizó la fórmula exacta hipergeométrica modificada, por medio del software FreeCalc (Cameron y Baldock, 1998). La prevalencia estimada fue del 10% para el ganado bovino y del 5% para los pequeños rumiantes, debido a la mayor susceptibilidad a la infestación descrita en el ganado bovino en comparación con las especies ovina o caprina (OIE, 2010). El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a la sensibilidad y especificidad mostradas por el CATT/*T. evansi* en el ganado bovino (83% y 96%, respectivamente, a una dilución 1:4) (Reid y Copeman, 2003). Las cabras presentan una mayor importancia económica y ostentan el mayor censo en las Islas Canarias, en comparación a vacas y ovejas. Por esta razón, en el ganado caprino se ajustó el nivel de significación y potencia a 0,01 y 0,98, respectivamente ( $\alpha$ : 0.01, 1- $\beta$ : 0,98); para las ovejas y vacas el nivel de significación y potencia fueron 0,05 y 0,95 ( $\alpha$ : 0.05, 1 - $\beta$ : 0,95), respectivamente.

Un total de 50 explotaciones lecheras de rumiantes colaboraron en este estudio entre octubre de 2007 y noviembre de 2008. Se estableció una línea imaginaria (cinturón sanitario) con un radio de 25 km de distancia de las explotaciones de camellos afectadas, con el fin de detectar posibles diferencias entre las poblaciones de rumiantes localizadas más cercanas y más lejanas a éstas. Teniendo en cuenta que el número

oficial de rebaños en la isla no está disponible, el muestreo se realizó a través de la colaboración de todos los veterinarios de las Agrupaciones de Defensa Sanitaria Ganadera de la isla de Gran Canaria. Estas áreas fueron clasificadas como de alta densidad ganadera (Norte y Este) y de baja densidad ganadera (Oeste y Sur) (Fig. 14). Los veterinarios fueron contactados al azar sin ninguna información previa por parte de nuestro grupo sobre las granjas a visitar cada uno de los días. Las granjas fueron clasificadas dentro o fuera de la zona sanitaria establecida (25 km) alrededor de las explotaciones de camellos afectadas.



**Figura 14.** Localización espacial de las granjas de rumiantes muestreadas en la isla de Gran Canaria.

Con un mínimo de 20 muestras de pequeños rumiantes y 10 muestras de vacas tomadas por granja (o todo el rebaño en las granjas que presentaban menos de este tamaño

mínimo), fueron seleccionados sistemáticamente un total de 1.228 rumiantes, conformado este número por 148 vacas, 687 cabras y 393 ovejas. Del total de rumiantes muestreados, 773 animales (63%) estaban situados fuera del cinturón sanitario y 455 animales (37%) situados dentro. A nivel de granja y excepto en las explotaciones con menos del número mínimo establecido, se tomaron muestras de sangre por selección del primero de cada tres animales que entraban en orden dentro de la sala de ordeño. Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena yugular en los pequeños rumiantes y de la vena caudal en el ganado bovino, y se recolectaba en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. Las muestras se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su llegada al laboratorio.

Los resultados fueron introducidos en una de base de datos y el análisis de los resultados se realizó a través del programa informático FreeCalc.

#### Prueba serológica (CATT/*T. evansi*)

Se realizó la prueba de aglutinación en placa para *T. evansi* (CATT/*T. evansi*, Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica) sobre las muestras de plasma de los rumiantes muestreados, siguiendo las recomendaciones del fabricante, con el fin de detectar la presencia de anticuerpos anti-*T. evansi*. Las muestras fueron analizadas a dilución 1:4 y se realizó dos veces en todas las muestras positivas con el fin de confirmar los resultados.

#### Prueba parasitológica

En todos los animales que presentaron resultados positivos a serología a través del CATT/*T. evansi* se realizó la técnica de centrifugación del microhematocrito –MHCT- (Woo, 1970). Para ello, se llenaron tubos capilares (2 por animal) con sangre entera procedente de cada uno de estos animales, se centrifugaron a 3000 g en una centrífuga de microhematocrito durante 5 minutos y luego fueron examinados al microscopio (x10) para detectar la presencia de tripanosomas móviles. Los animales negativos al método parasitológico pero seropositivos a través del CATT/*T. evansi*, fueron

examinados de nuevo un mes después, repitiéndose las pruebas parasitológicas y moleculares para confirmar o descartar la enfermedad.

#### Extracción de ADN y PCR de las muestras de sangre de los rumiantes

A las muestras de sangre de los animales con serología positiva mediante CATT/*T. evansi*, les fue extraído el ADN genómico utilizando QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden GE) disponible de forma comercial, y posteriormente el ADN purificado se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Se utilizaron cebadores dirigidos a una región específica y repetitiva para el subgénero *Trypanozoon*, pMURTec.F y pMURTec.R, para amplificar un fragmento de 227 pb a partir del ADN genómico. La PCR se realizó con un volumen de 25 µl de mezcla de reacción, compuesto por tampón de reacción 10X (Bioline), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 300 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) (Amersham), 100 ng de cebadores y 0,75U de Taq ADN-polimerasa (Bioline). La cantidad de ADN molde agregado por reacción fue de 2 µl. Los ciclos de la PCR incluyeron un paso inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 30 s. La elongación se continuó a 72 °C durante 5 min.

Para la detección de *T. evansi* se utilizaron cebadores dirigidos a una región del gen RoTat 1.2, que amplifican un fragmento de 205 pb del ADN genómico, siguiendo el método descrito por Deborggraeve *et al.* (2008), pero utilizando una temperatura de hibridación de 59 °C.

Para la realización de la electroforesis se añadieron siete microlitros de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% (Roche Diagnostic, Barcelona, España) con un marcador de peso molecular con escalones de 100 pb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5mg/L) y el análisis de imagen se realizó con un transiluminador UV (Bio-Rad Gel Doc <sup>TM</sup> EQ).

Como control se utilizaron muestras de un camello clínicamente enfermo de surra y con resultados positivos a las pruebas serológica y parasitológicas.

## **Resultados**

A la inspección visual, no se observaron evidencias clínicas de infestación por *T. evansi* a nivel individual (en animales muestreados) ni a nivel del rebaño. De acuerdo a la información aportada por los ganaderos, la enfermedad no había sido diagnosticada en sus rebaños en el pasado. Sin embargo, la mayoría de los ganaderos entrevistados informaron acerca de algunos signos que harían sospechar de infestación por *T. evansi*, tales como abortos y pérdida de peso.

De 1.228 muestras analizadas en el laboratorio, 61 (5%) fueron positivas al CATT/*T. evansi*. Por especies, el 4,7% de los bovinos fueron seropositivos (7/148), así como el 3% de las cabras (21/687) y el 8,4% de las ovejas (33/393). Casi la mitad de las granjas muestreadas (22/50) presentaron al menos un animal con reacción positiva al método serológico utilizado. Estas reacciones positivas al CATT/*T. evansi* se observaron en: 5 explotaciones de caprino y ovino (5/6), en 1 explotación de caprino y bovino (1/2), en 8 explotaciones de caprino (8/17), en 4 explotaciones de ovino (4/10), y en cuatro explotaciones de ganado vacuno (4/15). Algunas muestras que presentaron resultados poco claros o dudosos (+/-) y dieron resultado negativo en la segunda prueba, se consideraron finalmente negativos. Sin embargo todas las demás muestras con un resultado positivo (+, + +, + + +) en cualquier momento, siempre se consideraron positivas. En algunos casos, fue necesaria una tercera prueba a fin de considerar o descartar la positividad de muestras con resultados dudosos dos veces.

La técnica de centrifugación del microhematocrito no reveló la presencia de tripanosomas circulantes en ninguna muestra. Los 61 animales con resultados serológicos positivos en el primer examen fueron re-examinados un mes más tarde, con resultados negativos tanto por MHCT como por PCR.

Concerniente al cinturón de seguridad alrededor de las explotaciones de camellos afectadas, 44 animales seropositivos (72%) se localizaban fuera del cinturón epidemiológico, mientras que 17 animales seropositivos (28%) se localizaban en su interior. A nivel de rebaño, en el interior del cinturón sanitario, 7 granjas mostraron resultados positivos al CATT/*T. evansi* en al menos uno de sus animales (7/17): 2 explotaciones de caprino y ovino; 1 una explotación de caprino y bovino; 1 una explotación de ovino; y 3 explotaciones de cabras. Por otro lado, fuera del cinturón sanitario, 15 explotaciones mostraron resultados positivos para CATT/*T. evansi* en al menos uno de sus animales (15/33): 3 explotaciones de caprino y ovino; 4 explotaciones de ganado vacuno; 3 explotaciones de ganado ovino; y 5 explotaciones de cabras. La explotación de pequeños rumiantes más cercana a los camellos infestados se encuentra a una distancia aproximada de 200 metros. Respecto a la ubicación de los rebaños, la seroprevalencia de los animales localizados en el interior del cinturón sanitario fue del 3,73% (17/455), siendo ligeramente inferior a la mostrada por los animales situados fuera, con una seroprevalencia del 5,59% (44/773). Por lo tanto, estos resultados muestran *a priori* que pueden encontrarse reacciones positivas por toda la isla, y no es posible demostrar la correlación entre la aparición de reacciones serológicas positivas y la proximidad a las explotaciones de camellos afectadas.

El punto de corte para el número de positivos fue de 8 en el ganado bovino, 22 en el ganado ovino y 38 en el ganado caprino. Según la evaluación a través del programa FreeCalc, la población de bovino y caprino estaría libre de la enfermedad a la prevalencia mínima esperada establecida previamente (10% y 5%, respectivamente), con niveles de confianza del 99,8% y 100%, respectivamente. Sin embargo, los resultados mostrados por las ovejas no son adecuados para concluir que la población estaría libre de la enfermedad a la prevalencia mínima esperada del 5%.

## Discusión

No se observaron evidencias clínicas de infestación por *T. evansi* en ninguno de los individuos y granjas evaluadas. Algunas de los signos clínicos sospechosos informados por los ganaderos como abortos y pérdida de peso, son también comunes a muchas otras enfermedades y, por esa razón, no son concluyentes para el diagnóstico de *T. evansi*.

Los resultados a través del CATT/*T. evansi* indicarían una seroevidencia general de la infestación por *T. evansi* en los rumiantes de la isla de Gran Canaria en torno al 5%. A pesar de este supuesto anterior, el diagnóstico definitivo sólo se puede alcanzar mediante la detección de la presencia del parásito, que no pudo ser demostrado en ningún animal muestreado. De acuerdo al FreeCalc, la población de bovinos y caprinos estaría libre de la enfermedad; sin embargo, los resultados en ovejas no son suficientes para concluir que la población estaría libre de la enfermedad a la prevalencia mínima esperada del 5%.

Se podría pensar que por el hecho de que *T. evansi* fue introducido de forma puntual en un área en particular con un camello importado, y que las granjas afectadas están relativamente aisladas de otros animales, ello indicaría que los rumiantes domésticos no actuarían como reservorios de la enfermedad y, en consecuencia, no jugarían un papel relevante en la epidemiología de la enfermedad en la isla. Esta hipótesis también estaría sustentada por el hecho de que los animales serológicamente positivos se encontraron diseminados, presentando incluso una prevalencia ligeramente mayor en el norte de la isla (fuera del cinturón sanitario) sin aparente relación con las áreas afectadas. Sin embargo, y a pesar de todo, se deben tomar en cuenta algunas consideraciones antes de poder asumir esta hipótesis.

En primer lugar, es más frecuente la presencia de parasitemia baja o incluso ausencia en animales con baja susceptibilidad a la infestación, perteneciendo los pequeños rumiantes a este grupo de hospedadores (OIE, 2010). El ganado vacuno, por otro lado, no se considera tan sensible a la enfermedad en comparación con los equinos y camellos. Por lo tanto, la sensibilidad de ciertas pruebas de diagnóstico para detectar el

parásito, como son los métodos MHCT o PCR, puede ser muy baja para la evaluación de estos rumiantes. Por esta razón, muchos estudios epidemiológicos llevados a cabo en rumiantes en otros lugares se basan en la detección de anticuerpos circulantes, utilizando métodos como el ELISA o CATT/*T. evansi*. En nuestro estudio hemos preferido utilizar CATT/*T. evansi*, ya que se puede realizar a nivel de campo; el método parasitológico de primera elección fue el método MHCT, que se realizó en las muestras positivas al CATT/*T. evansi*, debiéndose hacer dentro de las primeras 3 horas después de extraída la sangre (Holland *et al.*, 2001). En cuanto a la sensibilidad del CATT/*T. evansi*, la mayoría de los estudios se han centrado en camellos, particularmente en dromedarios. En esta especie, la sensibilidad del CATT/*T. evansi* oscila entre el 65,5% (Njiru *et al.*, 2004) y el 89% (Diall *et al.*, 1994), con especificidades entre el 73% (Diall *et al.*, 1994) y el 100% (Ngaira *et al.*, 2003). La información relativa a la validez y utilidad de CATT/*T. evansi* en los rumiantes es escasa. En búfalos infestados de forma natural, las sensibilidades y especificidades variaron entre el 78% y 100% (Davison *et al.*, 1999) y el 100% y 98% (Verloo *et al.*, 2000), respectivamente. En ganado vacuno, Reid y Copeman (2003) determinaron una sensibilidad y una especificidad del 83% y 96% respectivamente, a diluciones 1:4, tal como recomienda el fabricante, siendo la misma que hemos utilizado en este estudio.

Dado que el parásito no pudo ser demostrado en ningún caso, los datos sobre la sensibilidad y la especificidad del CATT/*T. evansi* no pudieron ser determinados en nuestro caso. Reid y Copeman (2000) obtuvieron similares resultados en ganado bovino en Papua Nueva Guinea, donde 39 vacas resultaron positivas al método CATT/*T. evansi*, pero todos los animales fueron negativos en las pruebas parasitológicas. Ellos llegaron a la conclusión de que *T. evansi* no estaba presente o había sido introducido recientemente y que la zona no era endémica. Por otro lado, en un estudio realizado en Etiopía se remarcó el curso subclínico que toma la tripanosomosis por *T. evansi* en pequeños rumiantes, y se observó una prevalencia global del 34,4% mediante CATT/*T. evansi*, sin mostrarse signos clínicos ni mala condición corporal en ovinos y caprinos (Gebreyohans y Gangwar, 2010).

*T. evansi* fue diagnosticado por primera vez en las Islas Canarias en 1997 en un dromedario importado de Mauritania (Gutiérrez *et al.*, 2000). La enfermedad no se ha encontrado de forma natural en otras especies distintas a camellos; sin embargo, la seroevidencia de *T. evansi* en el ganado en Gran Canaria debe ser cuidadosamente evaluada, ya que podría haber ocurrido una posible extensión de la enfermedad.

Si en nuestro estudio consideramos la sensibilidad y la especificidad mostrada por Reid y Copeman (2003) en ganado bovino (83% y 96%, respectivamente), la razón de verosimilitudes positiva del CATT/*T. evansi* parece indicar que este resultado positivo es 20,75 veces más probable que provenga de un animal enfermo que de un animal libre del parásito. El hecho de que el parásito no fuera encontrado en los animales examinados no excluye la posibilidad de una verdadera infestación; sin embargo, podrían haber ocurrido posibles casos falsos positivos. El método CATT/*T. evansi* se basa en el tipo antigénico variable predominante de *T. evansi*, RoTat 1.2. De acuerdo a la información del fabricante del CATT/*T. evansi*, al emplear este método pueden ocurrir reacciones cruzadas en áreas donde pueden coexistir otras especies de tripanosomas de la sección Salivaria. Hasta el momento, sólo se tiene constancia de que *T. evansi* es el único tripanosoma de la sección Salivaria aislado en las Islas Canarias, por lo que se descarta esta última posibilidad. Otro tripanosoma, en particular perteneciente a la sección Stercoraria como es *Trypanosoma lewisi* (Subgénero *Herpetosoma*), ha sido observado por nuestro grupo en roedores silvestres en Gran Canaria, pero ninguna de las muestras analizadas presentó reacción positiva al CATT/*T. evansi* (Rodríguez *et al.*, 2010). *Trypanosoma theileri* y *Trypanosoma melophagium*, especies también pertenecientes a la sección Stercoraria (Subgénero *Megatrypanum*), tienen amplia distribución y no son patógenas para bovinos y ovinos, sus hospedadores rumiantes respectivos. Tripanosomas del subgénero *Megatrypanum* han sido citados en rumiantes domésticos y salvajes en España peninsular (Olmeda *et al.*, 2001; Villa *et al.*, 2008), pero no se han descrito en las Islas Canarias.

No se han investigado otras circunstancias particulares por las cuales puedan ocurrir casos falsos positivos a través de CATT/*T. evansi*. En el caso de nuestro estudio, las tres especies de rumiantes muestreadas han mostrado resultados serológicos positivos,

presentando el ganado ovino la mayor prevalencia (8,4%), seguido por el ganado bovino (4,7%) y caprino (3%).

Como conclusión, debe ejercerse vigilancia en las granjas de rumiantes de la isla de Gran Canaria, para poder evaluar la posible extensión de la enfermedad y su hipotético papel como reservorios potenciales de *T. evansi*. Deben incluirse programas periódicos de examen diagnóstico para *T. evansi* y, si se detecta la enfermedad, debe implementarse un plan urgente de control y erradicación

*Stomoxys calcitrans* como vector en la  
transmisión de la infestación por  
*Trypanosoma evansi* entre especies  
hospedadoras susceptibles en  
un área endémica de las  
Islas Canarias (España).

Traducido y adaptado de:

**Rodríguez N. F.**, Tejedor-Junco M.T.,  
González-Martín M., Doreste F, Gutiérrez C.

Enviado para su publicación (Medical and Veterinary Entomology)



***Stomoxys calcitrans* como vector en la  
transmisión de la infestación por  
*Trypanosoma evansi* entre especies  
hospedadoras susceptibles en  
un área endémica de las  
Islas Canarias (España).**

### **Introducción**

*Trypanosoma evansi* es el tripanosoma patógeno animal africano de más amplia distribución, y afecta tanto a ganado doméstico como a fauna silvestre en Asia, África y Latinoamérica (Luckins y Dwinger, 2004). Este parásito causa una enfermedad conocida como surra, la cual se transmite mecánicamente por moscas que pueden ser distintas a tse-tsé, y además por murciélagos vampiros en América del Sur. Afecta a un número amplio de animales domésticos, variando las principales especies hospedadoras de acuerdo a los continentes. Así búfalos, vacas, camellos y caballos son particularmente susceptibles, a pesar de que otros animales, incluyendo fauna silvestre, también pueden ser infestados (OIE, 2010). En cuanto a la transmisión de la enfermedad, muchos insectos hematófagos, especialmente tábanos (*Tabanus* spp.) y moscas de los establos (*Stomoxys* spp.) pueden transmitir *T. evansi* de forma mecánica de un huésped infectado a otro, aunque su papel como vectores puede variar en diferentes condiciones (Brun *et al.*, 1998).

*T. evansi* fue diagnosticado por primera vez en las Islas Canarias en 1997 en un dromedario infestado y que presentó la fase crónica de la enfermedad. Desde entonces, varios estudios serológicos y parasitológicos han sido llevados a cabo en la población de camellos, observándose prevalencias entre el 5 y el 9% (Gutiérrez *et al.*, 2000; Molina *et al.*, 2000). En consecuencia se estableció un programa para el control y eventual erradicación basado en la detección, aislamiento y tratamiento de los animales

infestados. Actualmente, la enfermedad se considera erradicada de las islas y zonas previamente infestadas a excepción de una pequeña zona de Gran Canaria (Gutiérrez *et al.*, 2010), donde *T. evansi* permanece aún activo. A este respecto, han sido propuestas dos hipótesis para explicar la persistencia del parásito en esta área: falta de eficacia del tratamiento tripanocida y/o resistencia al mismo, con consecuente recidiva de la parasitemia, o presencia de un reservorio en la zona afectada y posterior re-infestación. Para evaluar esta última posibilidad, nuestro grupo ha evaluado roedores silvestres (Rodríguez *et al.*, 2010) y rumiantes domésticos (Rodríguez *et al.*, comunicación personal) como posibles reservorios, pero *T. evansi* no fue encontrado en ningún animal muestreado. De hecho, la enfermedad ha estado presente en las poblaciones de camellos en estas áreas durante más de 10 años, sin haberse encontrado evidencias clínicas de la infestación natural en otras especies animales ubicadas en las zonas circundantes.

Ante estos hechos, el propósito de este estudio fue detectar insectos que podrían actuar como vectores potenciales de la enfermedad, así como evaluar si los protozoos podrían haber sido transmitidos a los equinos y convertirlos en reservorios de la enfermedad en la zona.

## **Material y métodos**

### Animales, muestras y procedimiento de muestreo

Se realizó un seguimiento a largo plazo (2001-2010) mediante la evaluación de un total de 864 muestras de sangre que procedían de equinos adultos pertenecientes a cuadras situadas cerca de las explotaciones de camellos infestados en la isla de Gran Canaria (Tabla 2). El área de estudio incluye un radio de 7,5 km en torno a las granjas de camellos afectadas y cubre una superficie total de 177 km<sup>2</sup> aproximadamente. Las cuadras fueron seleccionadas de acuerdo a la información de veterinarios clínicos, sobre la base de la disponibilidad de muestras de sangre en un estudio a largo plazo. El número total de cuadras situadas en esa zona se estima en 22, de las cuales fueron finalmente seleccionadas nueve para este estudio. Los establos fueron visitados cada año y el tamaño mínimo de la muestra fue de 5 animales por establo, o toda la población en los establos con número igual o inferior a 5 equinos. Se llevó un registro de cada

animal mediante un cuestionario, incluyendo la identificación (edad, sexo y la explotación de origen) y si los veterinarios y propietarios habían observado en el pasado algún signo clínico típico relacionado con la infestación por *T. evansi* tales como emaciación progresiva, anemia, edema o trastornos neurológicos.

A través de punción de la vena yugular se tomó un volumen de 9 ml de sangre de cada animal muestreado y se recolectó en tubos con EDTA como anticoagulante (Venosafe™, VF-109SDK, Terumo ®). Las muestras se mantuvieron en refrigeración (4° C) hasta su utilización en los procedimientos diagnósticos.

#### Prueba parasitológica

Con muestras de sangre con K<sub>3</sub>EDTA procedente de cada equino se llenaron tubos capilares (2 por animal) los cuales a continuación se centrifugaron en una centrífuga de microhematocrito durante 5 minutos a 3000g. Una vez centrifugados fueron examinados bajo el microscopio (x10) para detectar la presencia de tripanosomas móviles utilizando la técnica de centrifugación micro-hematocrito (MHCT) (Woo, 1970). Esta técnica se llevó a cabo *in situ* en las explotaciones en las primeras 3 horas después de que la sangre fuera tomada, tal como recomienda Holland *et al.* (2001).

#### Prueba serológica

Las muestras de plasma fueron analizadas para la presencia de anticuerpos anti-*T. evansi* mediante la prueba de aglutinación en placa para *T. evansi* (CATT/*T. evansi*, Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas a dilución 1:4 y todas las muestras positivas se analizaron una segunda vez a la misma dilución con el fin de confirmar los resultados. Las reacciones fueron evaluadas de acuerdo a la presencia o ausencia de gránulos de color azul y puntuadas como describe el fabricante.

Extracción de ADN y PCR de las muestras de sangre de los equinos

A pesar de que en un estudio experimental previo en equinos se eligió una reacción de aglutinación puntuada con 2 + como el punto de corte más bajo (Wernery *et al.*, 2001), todas las muestras que presentaron aglutinación desde un nivel leve a fuerte en nuestro estudio fueron sometidas a diagnóstico molecular para confirmar o descartar la infestación. El ADN genómico se extrajo de estas muestras utilizando QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden GE) disponible de forma comercial, y el ADN purificado se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

Se utilizaron cebadores dirigidos a una región específica y repetitiva para el subgénero *Trypanozoon*, pMURTec.F y pMURTec.R, para amplificar un fragmento de 227 pb a partir del ADN genómico (Wuyts *et al.*, 1994). La PCR se realizó con un volumen de 25 µl de mezcla de reacción, compuesto por tampón de reacción 10X (Bioline), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 300 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) (Amersham), 100 ng de cebadores y 0,75U de Taq ADN-polimerasa (Bioline). La cantidad de ADN molde agregado por reacción fue de 2 µl. Los ciclos de la PCR incluyeron un paso inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 30 s. La elongación se continuó a 72 °C durante 5 min.

Para la detección de *T. evansi* se utilizaron cebadores dirigidos a una región del gen RoTat 1.2, que amplifican un fragmento de 205 pb del ADN genómico siguiendo el método descrito, pero utilizando una temperatura de hibridación de 59 °C (Claes *et al.* 2004; Deborggraeve *et al.*, 2008)

Para la realización de la electroforesis se añadieron siete microlitros de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% (Roche Diagnostic, Barcelona, España) con un marcador de peso molecular con escalones de 100 pb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5mg/L) y el análisis de imagen se realizó con un transiluminador UV (Bio-Rad Gel Doc <sup>TM</sup> EQ).

Como control se utilizaron muestras de un camello clínicamente enfermo de surra y con resultados positivos a las pruebas serológica y parasitológicas.

#### Captura e identificación de moscas

Se utilizó una trampa para moscas picadoras (modelo Nzi) (Mihok, 2002), dada la alta eficacia demostrada para la captura de tábanos (Tabanidae) (van Hennekeler *et al.*, 2008) y moscas de los establos (Muscidae: Stomoxyinae) (Gilles *et al.*, 2007), probablemente las especies más comunes de moscas picadoras en los entornos ganaderos fuera de África. La trampa fue colocada dentro de la granja de camellos, y se mantuvo durante 12 meses (julio de 2010 hasta junio de 2011). Los insectos se recolectaron dos veces por semana y se preservaron en etanol hasta la identificación. Se contaron todos los insectos capturados y las diferentes especies de vectores potenciales de *T. evansi* fueron separadas de las demás e identificadas de acuerdo a Báez (1981) y Baéz y Portillo (1981).

#### **Resultados**

En cuanto a las evaluaciones de los equinos, un total de 864 muestras fueron examinadas durante los 10 años del estudio, de las cuales 26 (3%) presentaron algún grado de aglutinación al test serológico utilizado. Sin embargo, ninguna de las muestras examinadas fue positiva al método parasitológico (MHCT) ni molecular (PCR). En subsiguientes revisiones serológicas llevadas a cabo durante los años siguientes, las muestras mostraron una variabilidad en la reacción antígeno-anticuerpo, sin correspondencia entre los resultados positivos o negativos previos, exceptuando el caso de un caballo que presentó resultados positivos durante 4 años consecutivos. Sin embargo el parásito no se detectó en ningún examen. En la quinta evaluación de este caballo, llevada a cabo un año después, se observó serología negativa con ausencia de reacción antígeno-anticuerpo.

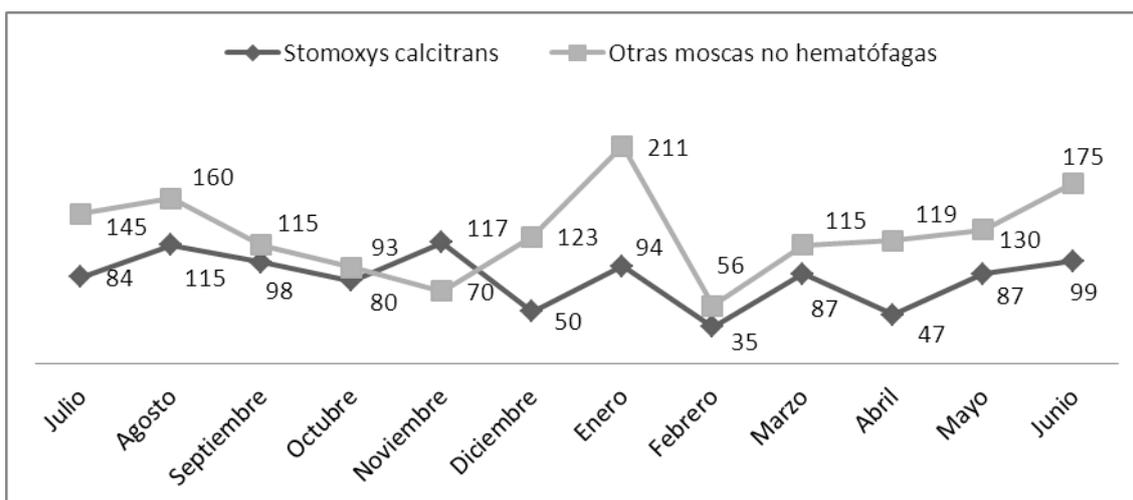
Las medidas de vigilancia ejercidas sobre los animales seropositivos no revelaron ningún signo clínico sospechoso relacionado con la infestación a lo largo del curso de este estudio. En contraste, estudios paralelos llevados a cabo al mismo tiempo en las

explotaciones de camellos, han demostrado que *T. evansi* se mantiene claramente activo en estos animales con presencia de nuevas infestaciones y también recidivas después de aplicar tratamientos.

En cuanto a posibles vectores mecánicos que podrían transmitir *T. evansi* en el área estudiada, la trampa utilizada resultó adecuada para la captura de moscas hematófagas y también algunas otras no hematófagas. *Stomoxys calcitrans* fue el único vector potencial de *T. evansi* entre las diferentes especies de dípteros capturadas entre julio de 2010 y junio de 2011 (Fig. 15). De un total de 2.505 dípteros capturados, 993 fueron *S. calcitrans*, y a lo largo de todo el período de captura, el número de *S. calcitrans* capturados fue siempre inferior al número de otros dípteros hematófagos exceptuando en el mes de noviembre. No se encontraron *Tabanus* spp., *Atylotus* spp. ni *Haematobia* spp. (sinónimo de *Lyperosia* spp.).

Año	Animales			Métodos diagnósticos		
	Equinos	Caballos	Asnos	CATT/ <i>T. evansi</i>	MHCT <sup>a</sup>	PCR <sup>b</sup>
2001	112	112	0	6	-	-
2002	140	128	12	5	-	-
2003	98	72	26	3	-	-
2004	81	74	7	1	-	-
2005	64	52	12	2	-	-
2006	103	81	22	3	-	-
2007	88	79	9	4	-	-
2008	73	60	13	0	-	NT
2009	48	39	9	1	-	-
2010	57	15	42	1	-	-
Total	864	712	152	26	0	0

**Tabla 2.** Muestras de equinos evaluados y resultados a lo largo del estudio (2001-2010), a través de los métodos diagnósticos utilizados. <sup>a</sup> Realizado sobre todas las muestras. <sup>b</sup> Realizado sobre muestras CATT/*T. evansi* positivas. NT: no testado



**Figura 15.** Número de *Stomoxys calcitrans* y otras moscas no hematófagas recolectadas en el periodo de captura (Julio 2010-Junio 2011).

## Discusión

A pesar de la presencia de *T. evansi* durante más de 10 años en las explotaciones de camellos en una pequeña zona de la isla de Gran Canaria, los equinos situados en la zona afectada no han sido aparentemente infestados. La ausencia de signos clínicos asociados a surra apoyaría estos resultados. Aunque a lo largo de este estudio se detectaron 26 muestras con reacción serológicamente positiva al CATT/*T. evansi*, no se encontró *T. evansi* mediante las técnicas diagnósticas parasitológicas o moleculares utilizadas. Una explicación podría ser que el método serológico CATT/*T. evansi*, preparado con tripanosomas fijados que expresan RoTat 1.2 (VAT predominante) también puede detectar *Trypanosoma equiperdum*, el agente causal de una enfermedad de caballos llamada durina, ya que expresa la misma glicoproteína variable de superficie que *T. evansi* (Claes *et al.*, 2003).

Sin embargo, aunque en España acontecieron episodios de durina hasta mediados del siglo pasado, actualmente el país se considera libre de esta enfermedad (Tarazona Vilas, 2007) y en el caso particular de las Islas Canarias nunca ha sido descrita. A esto hay que añadir que no se encontró ningún signo clínico típico que evidenciara la enfermedad en los equinos evaluados en este estudio. Por otro lado, se ha demostrado que la cepa de *T.*

*evansi* presente en las Islas Canarias afecta a otras especies animales además de camellos, como se ha observado en brotes producidos a nivel continental europeo después de la importación de camellos infestados desde Canarias., concretamente en España en el año 2008 donde afectó a equinos (Tamarit *et al.*, 2010), y en Francia donde se afectaron ovejas (Desquesnes *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta que *T. evansi* se ha mantenido activo en las explotaciones de camellos, el hecho de que no se hayan afectado, aparentemente los equinos que viven en las áreas circundantes podría estar relacionado con las especies de vectores existentes, por lo que decidimos estudiar la presencia de posibles vectores implicados en la transmisión de la enfermedad en esta zona. *Stomoxys calcitrans* fue la única mosca hematófaga capturada con la trampa utilizada. Esta especie de insecto presenta distribución a nivel mundial y es la más común entre las 18 especies diferentes que pertenecen a este género (Wall y Shearer, 2001). Un estudio sobre diversidad genética ha mostrado que no existen diferencias significativas entre poblaciones de *S. calcitrans* que habitan puntos geográficos distantes en el mundo (Dsouli Aymes *et al.*, 2009).

En los brotes ocurridos en Europa continental han estado implicados *S. calcitrans* y *Tabanus* spp. (Desquesnes *et al.*, 2008; Tamarit *et al.*, 2010) y se citan con frecuencia en la bibliografía como los vectores más comunes; sin embargo, en nuestra área de estudio no fueron atrapados especímenes de la familia Tabanidae. A pesar de que 96 especies de tábanos han sido descritas en España (Portillo, 1984), sólo dos especies han sido descritas en las Islas Canarias: *Atylotus canarius* y *Tabanus cordiger*, encontradas concretamente en las islas de Lanzarote, Fuerteventura y Tenerife, pero no en Gran Canaria (Báez y García, 2004), la isla donde ha persistido el protozoo.

*Stomoxys* spp. (Muscidae) muestra un patrón de alimentación heterogéneo sobre una especie hospedadora. Los estudios de campo han indicado que el dióxido de carbono es una kairomona importante para *Stomoxys* (Vale, 1980); otros estudios sugieren que el octenol y la acetona también pueden jugar un papel, pero los resultados son variables (Gibson y Torr, 1999). Es probable que el dióxido de carbono, generado en mayores cantidades por las especies de rumiantes, pudiera explicar la mayor atracción que manifiesta *S. calcitrans* hacia este ganado en comparación con la mostrada hacia los caballos (Warnes y Finlayson, 1987). Este hecho podría también explicar por qué la edad parece ser un determinante importante en la tasa de picadura en la alimentación de

*Stomoxys* spp. sobre el ganado (Schofield y Torr, 2002), ya que el ganado adulto produce mucho más dióxido de carbono que los terneros. Los camellos, sin embargo, no son considerados rumiantes verdaderos y están incluidos en el suborden Tylopoda, separado del suborden Ruminantia. Sin embargo, la producción anual de metano para los camellos es de 58 kg., 45 kg. para bovinos, y 18 kg. para caballos (Crutzen *et al.*, 1986), lo que supone alrededor de 1.3, 1 y 0.4 toneladas de dióxido de carbono por año, respectivamente.

Esta mayor producción de dióxido de carbono por parte de los camellos en comparación con los caballos podría haber contribuido a mantener *Stomoxys* alimentados con sangre parasitémica en estrecho contacto con el propio entorno de los camellos. Además, la ausencia de Tabanidae en la zona, insectos típicos que se alimentan sobre caballos (Foil *et al.*, 1989), ha contribuido probablemente a preservar a los equinos libres de la infestación debido a la mayor eficiencia en la transmisión por estos insectos frente a *Stomoxys*.

Desde el punto de vista epidemiológico, uno de los parámetros más importantes que influye sobre una enfermedad de transmisión vectorial es la tasa de picadura del vector, la cual es recíproca al periodo de tiempo entre sucesivas ingestas de sangre (Dye *et al.*, 1992).

Las diferencias en los niveles de ataque sobre hospedadores individuales dependen de las reacciones del hospedador frente al ataque (Warnes y Finlayson, 1987). La interrupción de la alimentación lleva a repetir la ingesta sobre varios hospedadores por lo que la tasa de picadura y transmisión de la enfermedad será mayor (Schofield y Torr, 2002). Observaciones realizadas en Zimbabue han mostrado que el 27% de *Stomoxys* realiza una comida completa (147 segundos) sobre hospedadores adultos, y que el 24% abandona al hospedador antes de completar su ingesta (59 seg), en gran parte como respuesta a la perturbación sufrida por el comportamiento defensivo del hospedador o por otras moscas (Schofield y Torr, 2002). En comparación con las mosca tse-tsé, *Stomoxys* muestra un comportamiento persistente y por lo tanto de mayor riesgo sobre el hospedador lo cual reflejaría su ciclo de vida más corto y, por otro lado, también una eficiencia bastante mayor en la alimentación (Schofield y Torr, 2002).

Por otro lado, el tiempo de supervivencia de los tripanosomas fuera de los hospedadores depende de la especie de vector involucrado y podría ser un factor limitante en la transmisión mecánica, atendiendo al tiempo que transcurre entre la alimentación sobre un hospedador infestado y la reanudación de la alimentación sobre un segundo hospedador no infestado. La anatomía del aparato bucal en los tábanos permite que la sangre remanente quede protegida de la desecación y como consecuencia, agentes patógenos tales como *T. evansi* puedan sobrevivir durante una hora o más (Kettle, 1995).

Además, los tábanos han sido señalados como vectores mecánicos particularmente eficientes debido a las molestias causadas a sus hospedadores que se defienden, lo cual asegura que la ingesta de sangre se interrumpa a menudo y sea seguida por una nueva ingesta sobre otro hospedador, aumentando así la probabilidad de infestaciones múltiples (Luckins, 1988).

De acuerdo a una revisión de Allan *et al.* (1987), *Stomoxys* spp. requiere ingestas de sangre una vez cada 24 horas. Otros autores han descrito, sin embargo, que estos insectos ingieren pequeñas cantidades de sangre sobre diferentes hospedadores y varias veces al día (Kettle, 1995; Wall y Shearer, 2001). En cualquier caso y a diferencia de los tábanos, las piezas bucales de las moscas de los establos no facilitan la supervivencia de estos parásitos por mucho tiempo. Se ha descrito que *T. evansi* presentando movilidad y presumiblemente viabilidad se mantuvieron en la probóscide de *Stomoxys* spp. durante unos 5-7 minutos después de la alimentación (Sumba *et al.*, 1998). De acuerdo a Moutia (1928), para la transmisión con éxito de *T. evansi* por moscas de los establos, el intervalo entre la ingesta de sangre sobre un animal infestado y otro sano no debe ser más de diez minutos.

Como conclusión, *S. calcitrans* parece ser el único vector implicado en la transmisión de *T. evansi* en el área endémica de las Islas Canarias, afectando especialmente a las poblaciones de camellos y, aparentemente no afectando como vector a los equinos, otra especie muy susceptible, presentes en la misma región. Por lo tanto, se deben implementar medidas de control contra *S. calcitrans* con el fin de minimizar el impacto de este importante vector en la zona y su papel en la transmisión de la enfermedad.

**Papel de los roedores silvestres en  
la transmisión de la infestación  
por *Trypanosoma evansi* en  
un área endémica de las  
Islas Canarias (España).**

Traducido y adaptado de:

**Rodríguez N. F.,** Tejedor-Junco M. T.,  
Hernández-Trujillo Y.,  
González-Martín M., Gutiérrez C.

Veterinary Parasitology, 174 (2010): 323–327



**Papel de los roedores silvestres en  
la transmisión de la infestación  
por *Trypanosoma evansi* en  
un área endémica de las  
Islas Canarias (España).**

**Introducción**

*Trypanosoma evansi* es el tripanosoma patógeno animal africano de más amplia distribución, y afecta tanto a ganado doméstico como a fauna silvestre en Asia, África y Latinoamérica (Luckins y Dwyer, 2004). Dicho protozoo afecta a un amplio número de animales domésticos, variando las principales especies hospedadoras de acuerdo con los continentes. Así búfalos, vacas, camellos y caballos son particularmente susceptibles, a pesar de que otros animales, dentro de los cuales se incluye fauna silvestre, también pueden ser infestados (OIE, 2009 ).

*T. evansi* fue diagnosticado en las Islas Canarias por primera vez en el año 1997 en un dromedario que había sido importado previamente desde Mauritania (Gutiérrez *et al.*, 2000). Después de la descripción de este primer caso fueron realizados estudios de prevalencia en el Archipiélago, mostrándose valores que iban desde un 4,8% utilizando CATT/*T. evansi* a un 9% con Ab-ELISA (Gutiérrez *et al.*, 2005). Con la finalidad de evitar la diseminación de la enfermedad, el Gobierno de Canarias estableció un plan de control en el cual se incluyó la inmovilización y el tratamiento (Cymelarsan<sup>®</sup>, Merial, Francia) de todos aquellos animales infestados. A pesar de estas medidas, volvieron a aparecer nuevamente animales infestados los cuales previamente habían sido tratados, e incluso fueron detectados nuevos casos correspondientes a animales previamente no

infestados. Dos brotes producidos por *T. evansi* acontecidos en Francia (Desquesnes *et al.*, 2008 ) y en territorio español peninsular (Tamarit *et al.*, 2010 ), ocurridos de forma puntual en explotaciones en las cuales había dromedarios importados desde Canarias, han demostrado que las medidas tomadas fueron insuficientes. Esta persistencia podría ser explicada a través de dos posibilidades: por un lado debido a la falta de eficacia del tratamiento empleado y recidiva consecuente; por otro lado debido a la presencia de un reservorio en la zona afectada y posterior re-infestación de los animales previamente tratados.

Las explotaciones de camellos afectadas se encuentran relativamente aisladas de otras explotaciones de ganado; sin embargo, la presencia de roedores silvestres es común en el área afectada. No hay mucha información en la bibliografía acerca del papel de los roedores salvajes en la epidemiología de infestaciones naturales por *T. evansi*. Por otra parte, *T. evansi* tiene una gran capacidad para infestar pequeños roedores, razón por la cual ratas y ratones se utilizan a menudo como modelo animal de inoculación (OIE, 2009). Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue evaluar el posible papel que podrían desempeñar los roedores silvestres en la transmisión de *T. evansi* en un área endémica desde hace más de 10 años.

## **Material y métodos**

### Animales y muestras

Durante ocho meses (noviembre 2009-junio 2010) un total de 138 roedores de vida libre fueron capturados con trampas selectivas. Fueron muestreadas zonas infestadas y no infestadas (Fig. 16) utilizando una aproximación normal a la distribución binomial para poblaciones grandes (infinita). El tamaño muestral (n=138) fue calculado utilizando un nivel de confianza del 95%, una precisión deseada absoluta del 5% y una prevalencia esperada del 10% (Thursfield, 2007). La zona principal de cría de camellos se encuentra centrada en el sur de la isla, con un censo en torno a 220 cabezas, estando

compuestas las áreas infestadas por dos explotaciones de camellos que pertenecen a un mismo propietario, con continuos movimientos de animales entre ellas. Estas explotaciones han sido establecidas para fines turísticos y de cría y la tasa de infestación puede ser estimada entre un 10 y un 20%. Fueron elegidas para formar parte de este estudio como áreas control, explotaciones lecheras de caprino y ovino sin ningún historial previo de infestación por *T. evansi*

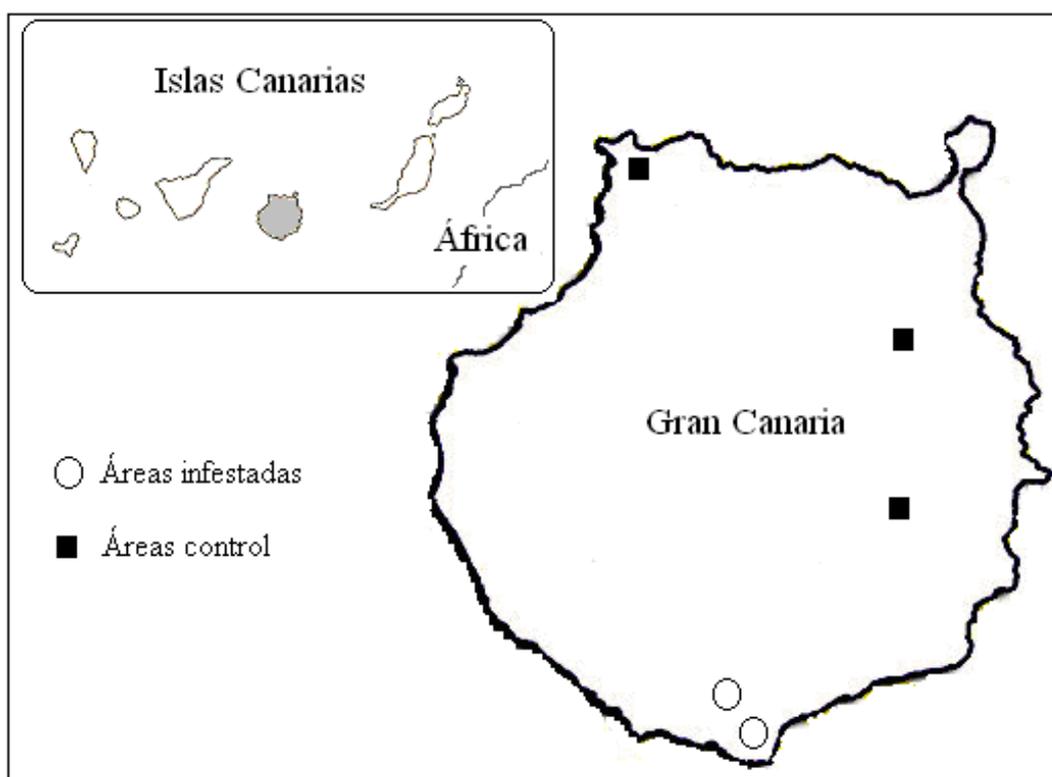


Figura 16. Situación geográfica de las Islas Canarias, la isla de Gran Canaria y los puntos de muestreo en los cuales fueron capturados los roedores.

De un total de 138 roedores, 64 fueron capturados en las explotaciones con camellos infestados y los 74 restantes fueron capturados en las granjas tomadas como control de la isla de Gran Canaria.

Solamente formaron parte de este estudio los roedores capturados vivos, y fueron descartados 8 animales encontrados muertos. Los animales fueron anestesiados con isoflurano (IsoFlo<sup>®</sup>, Dr.Esteve Lab.) a una concentración de 2-3% para la inducción y una concentración para mantenimiento del 0,25-2%. Durante la anestesia se obtuvieron muestras de sangre a través de punción cardíaca con agujas de 25 mm y 21-23 G, o por sección de venas yugulares en pequeños ratones. Las muestras fueron almacenadas en tubos de 1 ml con anticoagulante K<sub>3</sub> EDTA (Eurotubo<sup>®</sup>, Deltalab, España) y mantenidas a 4°C hasta su análisis dentro de las primeras 24 h tras su recolección. La extracción de ADN se llevó a cabo dentro de las primeras 24 h de haber sido extraída la sangre, y estas muestras de ADN fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior en la realización de la PCR. Una vez realizada la toma de sangre, los animales fueron eutanasiados con una sobredosis de tiopental sódico (Tiobarbital Braun 1G<sup>®</sup>, Palex, España). Cuando fue posible, (66 casos) se obtuvieron también a través de centrifugación muestras de plasma sanguíneo a partir de la sangre tomada, con el fin de realizar pruebas serológicas.

#### Prueba parasitológica

Con las muestras de sangre almacenadas con K<sub>3</sub> EDTA se rellenaron tubos capilares que fueron centrifugados en una centrífuga de microhematocrito durante 5 minutos a 3000g y examinados posteriormente para la presencia de tripanosomas móviles a través de la técnica de centrifugación del microhematocrito (MHCT) (Woo, 1970). Cuando una muestra fue positiva se realizó examen de frotis teñidos, extracción de ADN y PCR para *T. evansi* y *T. lewisi*, un tripanosoma común de roedores (Desquesnes *et al.*, 2002).

Prueba serológica (CATT/*T. evansi*)

A través de la prueba de aglutinación en placa para *T. evansi* (CATT/*T. evansi*, Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica) fueron analizadas para la presencia de anticuerpos anti-*T. evansi* muestras de plasma de 66 roedores, siguiendo las condiciones usadas para testar conejos (Verloo *et al.*, 2001). El volumen de plasma utilizado fue de 25 µl a una dilución 1:4.

Extracción de ADN y PCR de las muestras de sangre de los roedores

El ADN genómico se extrajo de las muestras de sangre de los roedores, utilizando QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden GE) disponible de forma comercial, y el ADN purificado se almacenó a -20 ° C para su uso posterior.

Para amplificar un fragmento de 227 pb a partir del ADN genómico se utilizaron cebadores dirigidos a una región específica y repetitiva para el subgénero *Trypanozoon*: pMURTec.F y pMURTec.R (Wuyts *et al.*, 1994). La PCR se realizó con un volumen de 25 µl de mezcla de reacción compuesto por tampón de reacción 10X (Bioline), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 300 µM de cada uno de los cuatro desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) (Amersham), 100 ng de cebadores y 0,75U de Taq ADN-polimerasa (Bioline). La cantidad de ADN molde agregado por reacción fue de 2 µl. Los ciclos de la PCR incluyeron un paso inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, hibridación a 60 °C durante 30 s, y extensión a 72 °C durante 30 s. La elongación se continuó a 72 °C durante 5 min.

Para la detección de *T. evansi* se utilizaron cebadores dirigidos a una región del gen RoTat 1.2, que amplifican una fragmento de 205 pb del ADN genómico, siguiendo el método descrito pero utilizando una temperatura de hibridación de 59 °C (Deborggraeve

*et al.*, 2008). De acuerdo a Desquesnes *et al.* (2002), las secuencias de los cebadores para la detección de *T. lewisi* fueron TRYP1R y TRYP1S. El protocolo de PCR fue el mismo que se indicó anteriormente, pero la temperatura de hibridación fue fijada en 55 °C.

Para la realización de la electroforesis se añadieron siete microlitros de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 2% (Roche Diagnostic, Barcelona, España) con un marcador de peso molecular con escalones de 100 pb. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0,5mg/L) y el análisis de imagen se realizó con un transiluminador UV (Bio-Rad Gel Doc <sup>TM</sup> EQ).

Como control para *T. evansi* se utilizó una muestra de sangre de un camello clínicamente enfermo de surra y con resultados positivos a las pruebas serológica y parasitológicas.

#### Secuenciación y la búsqueda de similitud de secuencias

Para la secuenciación, los productos de la PCR fueron purificados usando Quiagen PCR Purification System. Los fragmentos de la PCR purificados fueron secuenciados directamente en ambos sentidos utilizando los cebadores descritos (RoTat 1.2 y TRYP 1R y 1S) y el Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Las secuencias se analizaron con un secuenciador automático ABI 3130xl (PE Applied Biosystems).

El análisis de la secuencia y la búsqueda de similitud se llevaron a cabo con la herramientas básica de búsqueda local de alineación BLAST, en el sitio web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> usando la matriz por defecto.

**Resultados**

Los roedores capturados pertenecieron a las especies *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus domesticus*. La prevalencia por zonas y especies de roedores se resume en la Tabla 3. De un total de 138 muestras de sangre, 18 fueron positivas a través de MHCT (14 *Rattus rattus*, 3 *Rattus norvegicus* y 1 *Mus musculus domesticus*), de las cuales 16 (13 *Rattus rattus* y 3 *Rattus norvegicus*) fueron positivas en la PCR para *T. lewisi*; las 2 muestras restantes presentaron una cantidad de sangre insuficiente que no permitió realizar la identificación por PCR. No hubo evidencia de *T. evansi* y ninguna de las muestras fue positiva al CATT/*T. evansi* ni a la PCR utilizando los cebadores pMURTec.

Especies de roedores	Áreas infestadas			Áreas control		
	n	MHCT+	MCHT-	n	MHCT+	MCHT-
<i>Rattus rattus</i>	24	14	10	0	0	0
<i>Rattus norvegicus</i>	11	0	11	58	3	55
<i>Mus musculus domesticus</i>	29	0	29	16	1	15
Total	64	14	50	74	4	70

Tabla 3. Especies de roedores capturadas y prevalencia mostrada en las áreas infestadas y en las áreas control de Gran Canaria.

Por especies, *Rattus norvegicus* fue la especie de roedores más representativa de las capturadas (50%), seguida de *Mus musculus domesticus* (33%) y *Rattus rattus* (17%), aunque esta última mostró el mayor porcentaje intra-especie de parasitemia por *T. lewisi* (58%) en comparación con *Rattus norvegicus* (4%) y *Mus musculus domesticus* (2%).

Por otra parte, el 54% de *Rattus rattus* y el 4% de *Rattus norvegicus* fueron positivos a *T. lewisi* a través de PCR.

Por áreas, del total de 18 muestras diagnosticadas positivas a MHCT, 14 (78%) pertenecieron a roedores capturados en las explotaciones de camellos infestados, correspondiendo todas a la especie *Rattus rattus*. Por otro lado, 3 ejemplares de *Rattus norvegicus* y uno perteneciente a *Mus musculus domesticus*, atrapados en las áreas de control fueron también diagnosticados MHCT positivos. Entre los roedores en los cuales se confirmó parasitemia a través de MHCT (18), las muestras positivas para *T. lewisi* obtenidas a través de PCR (16) se obtuvieron en su mayoría de las explotaciones con camellos infestados (14 muestras: 87,5%) en comparación con las áreas control (2 muestras: 12,5%).

La PCR realizada con los cebadores TRYP1R y TRYP1S dio lugar a un producto de amplificación de 623 pb cuando *T. lewisi* estuvo presente en la sangre de los roedores. Cuando estos cebadores fueron utilizados para realizar PCR en muestras de camellos positivas a *T. evansi* se obtuvo claramente un producto de amplificación pero con una longitud de 520 pb. No se obtuvo ningún producto de amplificación cuando la sangre de los roedores fue probada con los cebadores utilizados para la detección del subgénero *Trypanozoon* y *T. evansi*.

Las secuencias de los productos de amplificación descritos se muestran en la Fig. 17 y Fig. 18. La Fig. 17 muestra la secuencia obtenida para el producto de amplificación de la sangre de los roedores utilizando los cebadores TRYP1R y TRYP1S. La Fig. 18 muestra la secuencia obtenida para el producto de amplificación de la sangre de los camellos utilizando los cebadores dirigidos a una región del gen RoTat 1.2.

CTTTTGTA**CTGCTCCGACGTGTTTTTTCGTGGGCGTGTGTATGTG**  
**CGTGCTTGTTCACATATACATATAAAACAAATACCACACAGACGCCACCA**  
**CACCACATCCATATACACGAGGTCAAGCGGCAAGTACTTTTTCCACAA**  
**CACTTAGAGCACACACACACTATATACATGTATATATATATATATATA**  
**TATGCGCACACTGTGTGCGAGGAGATATATATGTGTAGTGCGAAAAAGA**  
**GAGAGTGTGGGGGTGTGTGTGTGCGACACACACGGGGTACACACACAT**  
**ATATACATACACATTTGTATATGTATTATATACTTTCTCCCCTTTTTCAC**  
**ACACACACACACACTCCCCTCCTCTCGCGGGTGTGTATATATATATATA**  
**TACACACACACAATATAAAAACATCAGAAAAAGAGCCCGCTGCGCGCG**  
**CACACACAGATACAGTGAGATGACTCTCGCTCTCTCTATAGAATATATA**  
**TATGTGAGCTCTCTCTCACATAACACACCCGAGTGTGCGATCACGTGTA**  
**TCGCGCTCTCCTCAGACACACAGACGGGGTGTGTGTGAAATGAGGGGG**  
 GGGGAGAG

Figura 17. Secuencia de nucleótidos (591 pb) obtenida para el producto de amplificación de la sangre de los roedores usando el cebador TRYP1R. En negrita, la homología con ITS1 de *T. lewisi*.

AGGGACCGATGATTT**CGTTGTCGCAATACTGGGAACTCTGCTCGT**  
**TCTGGCTGGTCGTCAACTTTGCCTTCGATTAGGCCGTGTGCGAGGTGC**  
**ACCTTGATGTTGCTGGTCGCGATTTTGATCCCGCCGGGCTCGCCTTCTT**  
**TGCCGGATATTGCTTTAAACACCCCCACAATCTGATCATTTC AACGATG**  
**ATCCTTGTACAGTCGTTTGCTGGTTACGGGCCTACGCGCAGCTAGTAGTGAG**  
**GGGAGAGGAGCTAGGACAGAAGTGAAAGTTTGTTAAAGCTTGCATGAGCG**  
**AAGATCTTAAAAAGATTCTGTTTCGACGGGACTGCGAGGAGCTTCCAGAATG**  
**ACGAACACACCAGCACTAATAAGTTTTGGGGCTCACGCCCCGAATACAAG**  
 GGGCGCTAGTAGCTACTAGAACAGGTGGAGAGGGCGGACTACGAGGG

Figura 18. Secuencia nucleotídica obtenida para el producto de amplificación de la sangre de camellos usando el cebador RoTat 1.2 R. En negrita, homología con el gen RoTat 1.2 de *T. evansi* para la glicoproteína variable de superficie (VSG).

## Discusión

Los roedores podrían jugar un papel relevante en la epidemiología de *T. evansi* en condiciones naturales; sin embargo, su verdadero papel a nivel de campo sigue siendo poco claro. A nivel de laboratorio se emplea frecuentemente la inoculación en ratas y ratones, utilizados para revelar infestaciones subclínicas (no evidentes) en animales domésticos (OIE, 2009). En el campo, Herrera *et al.* (2004) describieron la infestación crónica por *T. evansi* sin signos clínicos aparentes en roedores salvajes (capibaras o carpinchos) del Pantanal brasileño, así como su papel en la dispersión y el mantenimiento de *T. evansi* en el área. Por otra parte Rademaker *et al.* (2009) informaron parasitemia en 6 de los 262 roedores atrapados (*Thrichomys pachyurus*, *Clyomys laticeps* y *Oecomys mamorae*) en un estudio en Brasil. Por otra parte, Jittapalapong *et al.* (2008) describieron infestación por *T. evansi* a través de diagnóstico molecular en 4 roedores silvestres (2 *Leopoldamys edwardsi*, 1 *Rattus andamanensis* y 1 *Rattus exudans*) en Tailandia. La alta prevalencia de *T. evansi* encontrada en capibaras brasileñas (Herrera *et al.*, 2004) apoya la idea del posible papel de los roedores como reservorios de tripanosomas patógenos y refuerza nuestro interés en analizar el papel de los roedores como reservorios del protozoo en las Islas Canarias. Sin embargo, las especies de roedores descritas anteriormente sólo se encuentran en América del Sur y Asia tropical, respectivamente. Por ello, las especies de roedores evaluadas en este trabajo, *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus domesticus*, que además presentan distribución mundial, podrían ser globalmente más representativas de la verdadera función de los roedores comunes en estado silvestre, en la epidemiología de la enfermedad.

A través de los métodos serológico, parasitológico y molecular utilizados en nuestro estudio, de 138 roedores examinados, *T. evansi* no fue detectado en ninguno. En particular, los roedores capturados en las granjas infestadas no mostraron ninguna evidencia de infestación por *T. evansi*. Estos resultados podrían indicar que las especies de roedores estudiadas podrían no jugar un papel relevante en la transmisión de la infestación por *T. evansi*; sin embargo, necesitamos más estudios que apoyen esta hipótesis. A este respecto, Rademaker *et al.* (2009) estudiaron pequeños roedores

brasileños y apreciaron baja parasitemia y, en consecuencia, concluyeron que los roedores jugaban un papel secundario en la epidemiología de *T. evansi*.

*T. lewisi*, sin embargo, parece ser un parásito común de roedores (Desquesnes *et al.*, 2002). La prevalencia global de la infestación por *T. lewisi* en las Islas Canarias (13%) es similar a la descrita en Estados Unidos (13,2%) (Eyles, 1952) y Ecuador (18,03%) (Pinto *et al.*, 2006 ) y ligeramente inferior a la descrita en Hawaii (25%) (Kartman, 1954) o Venezuela (21,3%) (Herrera y Urdaneta-Morales, 1997). En nuestro caso, la prevalencia de la infestación por *T. lewisi* confirmada por PCR fue del 54,3% en *Rattus rattus* (13/24), claramente superior al valor de 4,3% observado en *Rattus norvegicus* (3/69). En Hawaii las prevalencias fueron del 22,2% en *Rattus rattus*, del 11,4% en *Rattus norvegicus* y la más alta en *Rattus hawaiiensis* (48,8%) (Kartman, 1954). En Estados Unidos, *T. lewisi* fue encontrado en *Rattus norvegicus* (Eyles, 1952), y en Ecuador y Venezuela *T. lewisi* se detectó en *Rattus rattus* (Pinto *et al.*, 2006; Herrera y Urdaneta-Morales, 1997). En nuestro estudio, la prevalencia de *T. lewisi* fue mayor en los roedores capturados en las explotaciones afectadas por *T. evansi* (14/64), en comparación con las granjas control (4/74). Por otra parte, 87,5% de las muestras que fueron positivas a *T. lewisi* a través de PCR fueron obtenidas en las explotaciones de camellos donde *T. evansi* es endémico. Algunos factores ambientales deberían ser estudiados con el fin de avanzar en estos resultados.

En nuestra opinión, la PCR podría ser la técnica de referencia para evaluar estos tripanosomas. La PCR a partir de muestras de sangre de ratas infestadas por *T. lewisi* utilizando los cebadores TRYP1R y TRYP1S da lugar a un producto de amplificación de 623 pb, siendo claramente diferente a la longitud obtenida para *T. evansi* (muestras de sangre de camello, 520 pb). Esto es deseable ya que la diferenciación morfológica de ambas especies puede ser difícil. Varios autores (Ijaz *et al.*, 1998; Sengupta *et al.*, 2010) han descrito que la PCR es el método más fiable y sensible para la detección de *T. evansi* en roedores.

Similares resultados mostraron que la secuencia del producto de amplificación obtenido de la sangre de los roedores parasitéticos utilizando los cebadores TRYP1S y

TRYP1R, tiene un alto porcentaje de similitud (94%) con secuencias publicadas para *T. lewisi* ITS1 (GenBank número de acceso GU252220).

La secuencia obtenida para el producto de amplificación de la sangre de los camellos utilizando los cebadores dirigidos a una región del gen RoTat 1.2 tenía un 92% de homología con la descrita por Sengupta *et al.* (2010) de *T. evansi* aislado de la India (EF495337) y *T. evansi* aislado en Kenia (AF317914). Cuando se comparó con *T. evansi* aislado de Kenia (AF317914) se obtuvo un 88% de homología. Se observó una homología parcial (283 pb) con el gen 18S ARNr de *T. evansi* al comparar la secuencia del producto de amplificación de la sangre de camello utilizando los cebadores TRYP1R y TRYP1S.

*T. evansi* y *T. lewisi* son parásitos de animales, a priori no patógenos para seres humanos. Sin embargo, *T. lewisi* ha causado recientemente enfermedad clínica en un niño de Tailandia (Sarataphan *et al.*, 2007). *T. evansi*, por otro lado, ha causado infestación en un granjero de la India (Joshi *et al.*, 2005 ), lo cual fue relacionado a un déficit de APOL1 debido a mutaciones de cambio en ambos alelos APOL1 (Vanhollebeke *et al.*, 2006).

## V. CONCLUSIONES



**PRIMERA.** Para el diseño de estudios epidemiológicos y por motivos de costo-efectividad, disponibilidad, consumo de tiempo y posibilidad de realizar la prueba a nivel de campo, la técnica MHCT aplicada al diagnóstico de *T. evansi* en caprinos seropositivos es adecuada como método de elección (sensibilidad del 93%), pudiéndose utilizar la PCR como segundo método de elección para muestras negativas a MHCT.

**SEGUNDA.** No se ha confirmado infestación natural por *T. evansi* a través de MHCT y PCR en ninguno de los rumiantes de la isla de Gran Canaria incluidos en este estudio y, por tanto, no puede establecerse un claro reservorio del parásito. Sin embargo, la seroevidencia a través del CATT/*T. evansi* en todas las especies muestreadas y de forma especial en ovino, podría recomendar vigilancia a través de evaluaciones periódicas.

**TERCERA.** No se ha confirmado infestación natural por *T. evansi* en équidos en la isla de Gran Canaria mediante los mismos métodos parasitológicos y moleculares, pero la presencia de algunas reacciones serológicas al CATT/*T. evansi* indica la importancia de la vigilancia en estas especies, particularmente cuando son consideradas especies altamente susceptibles.

**CUARTA.** *Stomoxys calcitrans* es el vector potencial responsable de la transmisión de *T. evansi* en el área estudiada, dado que fue el único insecto hematófago detectado. De acuerdo a la biología de este díptero se podría explicar que el protozoo se haya mantenido en la población de dromedarios y no se haya difundido a otras especies ganaderas (rumiantes y équidos).

**QUINTA.** A pesar de haberse realizado la primera descripción de *T. lewisi* en roedores en Canarias, lo cual supone un hallazgo importante de cara a la salud pública, no se observó en estos animales la especie parasitaria de interés de esta Tesis, por lo cual los roedores silvestres podrían no jugar un papel relevante en la epidemiología de *T. evansi* en la isla de Gran Canaria.



VI. TRABAJO *IN SITU* EN ÁREAS AFECTADAS  
Y PERSPECTIVAS DE FUTURO



# **1. Situación actual de la población de camellos afectada por surra en Gran Canaria y perspectivas de futuro derivadas de los resultados obtenidos**

## **1.1. Introducción**

La cría y explotación de camellos en Canarias se centró durante muchos años en el empleo de estos animales para las labores agrícolas. Sin embargo, a partir de los años 60 del pasado siglo, el turismo se consolidó como el nuevo motor económico que propulsó al Archipiélago y el enfoque de la rentabilidad de esta especie cambió. Desde entonces, estos animales han sido protagonistas de una novedosa actividad destinada al ocio que combina paseos en camellos y visita a algunos lugares de interés turístico. En este sentido, estos animales son criados en grupos para tal fin en lugares concretos de las islas de Lanzarote, Fuerteventura y Gran Canaria, y en menor medida en la isla de Tenerife.

Tras el diagnóstico del primer caso de *T. evansi* en un dromedario en la isla de Gran Canaria en 1998, se observaron seroprevalencias en la ganadería camellar del Archipiélago que oscilaban entre un 7,5% en la isla de Tenerife y un 10% en la isla de Gran Canaria mediante IgG-ELISA (Molina *et al.*, 2000); y desde un 7,1% en la isla de Lanzarote hasta 0% en la isla de Tenerife mediante el método CATT/ *T. evansi* (Gutiérrez *et al.*, 2000). Como medida de control se realizó tratamiento con Cymelarsan<sup>®</sup> (melarsamina) que se administró a dosis de 0,25 mg/kg de peso vivo, en todos los camellos que mostraban signos clínicos de surra, así como en aquellos que, a pesar de no mostrar clínica, sí presentaban evidencias serológicas y/o parasitológicas.

Con la aplicación de estas medidas, la seroprevalencia disminuyó y alcanzó el 0% en el año 2003 en las islas de Tenerife, Fuerteventura y Lanzarote, manteniéndose esta prevalencia hasta el 2008 (Gutiérrez *et al.*, 2010). Sin embargo, en la isla de Gran Canaria se observó una reaparición de la surra en dromedarios entre octubre y noviembre de 2002, con una presentación aguda de la enfermedad asociada a un foco de abortos y alta mortalidad neonatal (Gutiérrez *et al.*, 2005). Después de un silencio

epizoótico, este foco de abortos, rápidamente controlado mediante la administración de melarsamina a los animales afectados, subraya la dificultad de erradicar *T. evansi* de un territorio que, sin embargo, se había saneado previamente (grupo *ad hoc* NTTAT de la OIE. 74ª Sesión General, París, 21-26 de mayo de 2006).

A pesar de que no existen datos oficiales, se podría considerar que actualmente la isla de Gran Canaria presenta un censo aproximado de 220-250 animales de la especie *Camelus dromedarius*. Este censo se concentra de forma principal en cuatro explotaciones al sur de la isla, en San Bartolomé de Tirajana, municipio eminentemente turístico. Dos explotaciones se encuentran ubicadas en las medianías del municipio con un censo en torno a 100 animales; las otras dos están ubicadas en la zona costera, con mayor actividad turística, y presentan un censo mayor. En estas últimas se observó la reaparición de *T. evansi*, y no ha podido ser erradicado hasta el momento.

Tras la reaparición de la enfermedad, se investigaron los camellos presentes en las explotaciones ubicadas en medianías, sin detección de animales serológicamente ni parasitológicamente positivos. En el resto de la isla pueden existir algunos pocos particulares que tienen en propiedad algún camello, a los cuales no ha habido acceso, por la dificultad para su localización e inexistencia de un censo oficial.

A partir de la reaparición de la enfermedad descrita en el año 2005, se planteó la posibilidad de realizar campañas masivas de tratamiento y se estableció su recomendación en la población de camellos como medida preventiva o terapéutica, de cara a controlar o lograr una eventual erradicación de la enfermedad. Con la autorización expresa por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios pudo adquirirse Cymelarsan<sup>®</sup> que fue importado desde el Laboratorio Merial en Francia.

## **1.2. Descripción de la situación y manejo actual en las explotaciones afectadas. Peculiaridades que influyen en el diseño de un plan de control**

Existen dos explotaciones afectadas por surra, pertenecientes a una misma empresa, con un censo actualizado de 127 cabezas a junio de 2011. En cuanto a la descripción de la

situación y manejo de las explotaciones de interés, se dan particularidades que influyen en el diseño del plan de control y erradicación de la enfermedad. A continuación se realiza una breve descripción de las dos explotaciones, a las que se ha designado con las letras A y B:

#### Explotación A.

Esta explotación está destinada al recreo de turistas y supone la mayor actividad turística de todas las explotaciones de la isla. Los animales están en su mayoría identificados, bien por un nombre asignado por el personal o bien por crotales auriculares. Los camellos de esta explotación, en su mayoría, están domados para la actividad a la cual se destinan. Los animales domados facilitan el trabajo a la hora de las tomas de muestras; por ello sólo se precisa para el manejo la asistencia de un ayudante, quien sostiene a los animales que se mantienen en decúbito esternal.

#### Explotación B.

Esta explotación está destinada a la cría y reposición de animales para el trabajo en la explotación A. Los animales se mantienen en corrales que pueden albergar hasta 30 animales. El manejo en esta explotación es complicado, debido a que los animales en su mayoría no están aún domados, por lo que se precisa personal muy entrenado para capturar uno a uno a lazo, con los peligros que ello entraña. Además, muchos animales no están identificados con crotales auriculares y la mayoría no tienen asignado nombre que los identifique.

Actualmente y como requisito previo, todos los animales que se transportan de una explotación a otra son revisados y tratados con Cymelarsan<sup>®</sup>, siempre que muestren positividad a CATT/*T. evansi* y/o técnica de concentración del microhematocrito.

Aparte del método de manejo descrito que diferencia a las dos explotaciones, otra limitación en cuanto al trabajo a realizar concierne al sistema de identificación. La identificación en esta especie a través de crotales auriculares no es la más idónea, produciendo a veces molestias que hacen que los animales se froten contra las paredes. Como consecuencia, en ocasiones se desprenden pudiendo producir defectos estéticos y sobre todo pérdida de la trazabilidad que dificulta el trabajo de control. Para intentar

minimizar este problema, se realiza también identificación con marcadores de ganado en spray, no siendo del todo efectivo con el paso del tiempo.



**Figura 19.** Trabajo *in situ* en explotación de camellos. Fotografías de trabajo en la explotación B, en la cual los animales en su mayoría no están adiestrados. (A) Captura a lazo de cada uno de los animales. (B) Se muestran en círculos los números marcados con spray sobre cada uno de los animales. (C) Animal con una extremidad sujeta con una cuerda (flecha) para limitar su movilidad durante el trabajo. (D) Animal “tuchido” (decúbito esternal) sujeto con cuerdas (flecha).

En las dos explotaciones se realizan revisiones periódicas mediante técnicas serológicas y parasitológicas en todos los animales que presentan signos clínicos sospechosos de surra, entre los que se incluye de forma general adelgazamiento progresivo y edemas en partes declives del cuerpo (sobre todo extremidades, y prepucio en machos). En los casos positivos se lleva a cabo el tratamiento.

### 1.3. Acciones llevadas a cabo en las explotaciones afectadas

Las campañas de tratamiento masivo con Cymelarsan<sup>®</sup> en la población afectada no fueron efectivas, tal como se demostró por la aparición de brotes puntuales en Aveyron (Francia) y Alicante (España), tras la importación de camellos desde esta región a mediados de 2006 y principios de 2007, respectivamente (Desquesnes *et al.*, 2008; Tamarit *et al.*, 2010).

Por las razones expuestas con anterioridad, al mismo tiempo que se ha desarrollado el trabajo de esta tesis entre los meses de octubre de 2007 y octubre de 2011, el plan de acción frente a esta enfermedad, el cual aún no ha concluido, se ha centrado en las dos explotaciones en las cuales hasta el momento persiste el parásito.

En primer lugar, la totalidad de la población en las dos explotaciones afectadas fue tratada en noviembre de 2007. A un total de 194 animales les fue administrado Cymelarsan<sup>®</sup> a una dosis de 0,5 mg/kg de peso vivo.

En el año 2008, entre los meses de julio y septiembre fueron revisados un total de 92 animales como control colectivo en las explotaciones afectadas. El trabajo se llevó a cabo a través de una o dos visitas semanales durante julio y agosto, y la última visita se realizó a los 22 días de la penúltima visita. Se realiza toma de sangre en vena yugular y se recolectó en tubos con anticoagulante. Para el diagnóstico se emplearon CATT/*T. evansi* como método serológico, y MHCT y/o PCR como métodos parasitológico directo y molecular, respectivamente. Las técnicas CATT/*T. evansi* y MHCT se realizaron *in situ*, en las explotaciones. La PCR se realizó al final del periodo con muestras mantenidas bajo congelación.

En este control aparecieron nuevamente animales con parasitemia, a pesar de haberse realizado una campaña terapéutica masiva a finales del año anterior. Por esta razón, los animales que presentaron resultados serológicos positivos en la primera revisión fueron los objetivos a revisar durante todo este periodo de control. A este respecto, algunos animales fueron revisados hasta en siete ocasiones, por presentar resultados serológicos positivos y no evidenciar parasitemia. Fueron tratados los animales que presentaron parasitemia diagnosticada a través de MHCT y/o PCR.

Durante todo el periodo de revisión se confirmó la parasitemia en 23 animales a través de la técnica de MHCT y/o PCR. A través de MHCT realizado en la primera revisión por animal, se evidenció parasitemia en 8 animales, que además también se confirmaron a través de PCR (8 animales positivos a PCR). El resto de animales diagnosticados a través de MHCT en sucesivas revisiones, fueron apuntados previamente por presentar serología positiva en las revisiones anteriores. Esto pone en evidencia la dificultad que muestra el diagnóstico de *T. evansi* dependiendo del momento en el que se realice, pudiéndose observar así resultados falsos negativos a través de técnicas parasitológicas directas, en animales aparasitémicos pero que realmente están infestados. Este fenómeno se produce debido a que el parásito se puede albergar en focos extravasculares y presentar una fase sanguínea de forma irregular en el tiempo, en llamadas “oleadas parasitémicas”. Además, el protozoo es capaz de evadir la respuesta del sistema inmunológico del hospedador, debido a la envoltura que presenta de VSG, basándose el CATT/*T. evansi* en la detección de anticuerpos frente a un tipo antigénico variable predominante (RoTat 1.2).

En base a que se realizó PCR al final de este periodo de control y se contrastó con las analíticas previas realizadas *in situ*, como ejemplo de este fenómeno figura un animal que presentó reacción al CATT/*T. evansi* en su primera revisión y posteriores, y la parasitemia fue confirmada a través de MHCT en su quinta revisión:

7/7/2008: MCHT negativo; banda débil a PCR;

14/7/2008: MHCT negativo; PCR negativa;

22/7/2008: MCHT negativo; banda débil a PCR;

1/8/2008: MHCT negativo; PCR no testada;

25/8/2008: MHCT positivo; PCR positiva (en este momento se realizó el tratamiento);

22/9/2008: MHCT negativo; PCR negativa.

Durante este periodo de control para 2008, 28 animales presentaron reacción al CATT/*T. evansi*, de los cuales la mayoría (25 animales), la mostraron en la primera vez que se les realizó revisión durante dicho periodo. Esta observación pone de relieve la importancia del método serológico en la detección de posibles portadores del protozoo, sirviendo así como guía para seleccionar los animales sobre los que realizar el trabajo posterior.

No obstante, se observaron 3 animales que no mostraron reacción serológica, pero fueron diagnosticados positivos tanto a través de MHCT como de PCR. Esto podría indicar una infestación muy temprana que no ha permitido una respuesta del sistema inmunológico de los animales que pueda ser valorada a través del CATT/*T. evansi*, el cual detecta anticuerpos circulantes. Este fenómeno subraya la necesidad de tener en cuenta la vigilancia en los animales que presenten resultados serológicos negativos, en el diseño de la planificación del control de todo el colectivo en estas explotaciones. Este tipo de animales podrían ser obviados mientras se vuelca todo el esfuerzo sobre los seropositivos, y como consecuencia, animales aparentemente libres de la enfermedad, podrían convertirse en reservorios potenciales.

En mayo de 2009 se revisaron 15 animales de la explotación B, y sólo un animal presentó reacción positiva fuerte al CATT/*T. evansi*, el cual fue diagnosticado parasitémico mediante MHCT. Además, y en relación con el párrafo anterior, se observó otro animal con parasitemia mediante MHCT, pero que no mostraba reacción al CATT/*T. evansi*. Estos animales fueron tratados, y al mes siguiente no se observó parasitemia, y sólo mantuvo reacción serológica el animal que previamente fue CATT/*T. evansi* positivo.

Entre diciembre de 2009 y enero de 2010 se realizaron seis visitas a la explotación A y se revisaron un total de 64 animales, encontrándose parasitemia mediante MHCT en dos animales en la primera revisión por animal. En cuanto a la detección serológica, 24 animales presentaron reacción en distinto grado al CATT/*T. evansi* en la primera revisión por animal. En la última visita de este periodo se revisaron mediante MHCT los animales que habían mostrado reacción serológica previamente, y se observó parasitemia en otros dos nuevos animales. De cuatro animales en los que finalmente se evidenció parasitemia mediante MHCT, dos animales habían sido previamente diagnosticados positivos y tratados hacía aproximadamente año y medio, lo cual podría ser explicado en base a dos posibilidades: por reinfestación de los animales, o por ineficacia del tratamiento.

Entre noviembre de 2010 y marzo de 2011 se realizaron un total de 49 revisiones aleatorias en las explotaciones afectadas, en las cuales siete animales fueron revisados dos o tres veces. Se constató parasitemia en 3 animales a través de MHCT.

En febrero de 2011 como control de otros colectivos *a priori* no infestados, fueron revisados los dromedarios pertenecientes a otra explotación de las medianías del municipio de San Bartolomé de Tirajana, en la cual se confirmó ausencia de reacción al CATT/*T. evansi* y MHCT.

Entre los meses de marzo y julio de 2011 se revisaron todos los animales presentes en la explotación A. Se emplearon como técnicas diagnósticas el CATT/*T. evansi* y MHCT. Fueron analizados 62 animales, y se repitieron revisiones en los animales que mostraron reacción al CATT/*T. evansi* en la primera revisión por animal, por lo que durante este periodo se realizaron hasta 6 revisiones en algunos animales. Finalmente se pudo demostrar parasitemia a través de MHCT en 16 animales, los cuales fueron tratados en el momento de la detección del parásito. En 5 animales que presentaron serología positiva no se pudo evidenciar la parasitemia, pero fueron tratados en la última visita.

Como dato a tener en cuenta en este periodo en la explotación A, de cara al diseño del plan de control, 3 animales que habían mostrado parasitemia en su primera revisión de este periodo y que fueron tratados en consecuencia, volvieron a mostrar parasitemia a los 95-97 días tras el primer tratamiento, por lo que tuvieron que recibir nuevamente tratamiento.

De acuerdo a las peculiaridades descritas en la explotación B, la revisión de todos sus animales en 2011, se realizó durante 3 días del mes de junio. Se realizó tratamiento de todos los animales que presentaron parasitemia a través de MHCT y/o reacción al CATT/ *T. evansi*. Un total de 65 animales fueron evaluados y 23 animales mostraron reacción al CATT/*T. evansi* en distinto grado, de los cuales 15 mostraron parasitemia a través de MHCT. No se observó ningún caso seronegativo con parasitemia. Estos 23 animales pendientes de reevaluación a fecha de escritura de este capítulo, están separados del resto del colectivo dentro de la explotación para continuar con el plan de trabajo.

#### **1.4. Planificación de futuro para el control y eventual erradicación de la enfermedad**

A la par de la vigilancia y tratamiento en la población de camellos afectados, se recomendó la vigilancia en otras especies distintas al camello, tras la sospecha de la existencia de un reservorio en el cual podría persistir *T. evansi* de manera asintomática, siendo esta idea el punto de partida de este trabajo de Tesis Doctoral.

La enfermedad se ha descrito en ganado en diversas zonas del mundo, pudiendo estos animales actuar como reservorios del protozoo. Para valorar esta posibilidad, en el periodo comprendido entre octubre de 2007 y noviembre de 2008, nuestro grupo analizó un total de 1228 rumiantes entre bovinos, caprinos y ovinos procedentes de 50 explotaciones ganaderas de Gran Canaria (Artículo 2). Para completar una visión global de la situación se describió la presencia del vector involucrado en la transmisión de la enfermedad en la zona afectada, y se relacionó con los resultados de la vigilancia en équidos de la isla en esta última década (Artículo 3). Asimismo, y en la misma línea sobre la investigación de posibles reservorios se realizó un estudio sobre el papel de los roedores en la epidemiología de la enfermedad, con la captura de 138 ejemplares de vida libre entre noviembre 2009 y junio 2010 (Artículo 4).

El trabajo y los resultados obtenidos se recogen en el Capítulo IV (Relación de artículos) de esta Tesis Doctoral, no habiéndose observado parasitemia por *T. evansi* en ninguno de los animales estudiados hasta el momento, distintos a los camellos, como para establecer un claro reservorio. La persistencia del protozoo en camellos en esta región junto a los resultados obtenidos en la Tesis inclina la balanza más hacia la idea de que el reservorio del protozoo se encuentra en los propios camellos infestados de forma crónica.

Por esta razón, dentro de las perspectivas de futuro y aplicación del conocimiento obtenido hasta el momento en esta Tesis, como objetivo principal se encuentra continuar con el estudio de la enfermedad en este colectivo de camellos afectados, pasando a un plano secundario la vigilancia en otras especies, aunque ello no quiere menospreciar la vigilancia a realizar sobre las mismas. Para realizar este trabajo que tiene como objetivo final el control y erradicación definitiva de la enfermedad, es

primordial diseñar una planificación adecuada con toda la información registrada hasta el momento. Cuando sea conseguido dicho objetivo se expondrá a la comunidad científica, para validar las acciones implementadas.

En primer lugar, el trabajo a realizar requiere una dedicación y atención veterinaria a través de revisión continua y sistemática en las dos explotaciones afectadas. A este respecto, y teniendo en cuenta que se han observado camellos que habiendo sido tratados, vuelven a presentar parasitemia al cabo del tiempo, se debe diseñar un protocolo terapéutico estricto con aplicaciones espaciadas en el tiempo, estableciendo los intervalos de dosificación y realizando un seguimiento exhaustivo de los animales positivos, y sobre todo de los animales crónicamente infestados, que se convierten en reservorios potenciales del protozoo. No existen protocolos definidos en este sentido, y a pesar de que el fabricante de Cymelarsan<sup>®</sup> propone una sola dosis como curativa, nuestro grupo ha observado casos de surra recidivantes. Otros autores han descrito también recidivas tras el tratamiento con esta droga en condiciones experimentales (Wernery *et al.*, 2001). Otra de las posibilidades a contemplar sería la de combinar el uso de varias drogas disponibles para el tratamiento, como propuso Desquesnes *et al.*, (2008) en el brote producido en Francia, aunque no aportaban información sobre intervalos de dosificación en la combinación de los principios activos utilizados.

El tratamiento preventivo frente a vectores de *T. evansi* es otro aspecto sobre el que hay que incidir en las explotaciones afectadas. A este respecto conviene revisar los productos que ya son utilizados y los periodos de empleo de los mismos, y hacer una valoración crítica de sus usos. Otras alternativas, como el control biológico de vectores, podrían ser valoradas.

Otro punto importante a mejorar en las explotaciones afectadas es el sistema de identificación, el cual, a pesar de no incidir directamente en la enfermedad, es primordial a la hora de planificar las revisiones y tratamientos, para no cometer errores.

Por todo lo anterior y de acuerdo con los resultados y conclusiones extraídas de esta tesis, con el trabajo realizado hasta el momento en el área afectada, cuya realidad muestra aún la persistencia del protozoo, nuestro grupo de investigación propone una serie de líneas de acción a seguir posterior a la lectura de esta tesis. Estas líneas han de

llevarse a cabo a través de una programación de visitas semanales o quincenales hasta alcanzar los objetivos de control fijados. Por tanto proponemos:

- Asegurar un sistema de identificación que permita seguir el rastro de los animales, a lo largo de todo el periodo de control. Valorar la posibilidad de aplicar microchips, crotales o spray marcagano (con éste último remarcar de forma semanal).
- Diseño y construcción de una manga de ganado que facilite el trabajo y ahorre mano de obra en la explotación B. De esta forma se realizará más fácilmente la toma de sangre de los animales y se evitará la captura de cada uno a lazo.
- Como primera acción en cada una de las explotaciones afectadas, se debe comenzar por la revisión de cada uno de los animales presentes, para detectar los que muestran positividad al CATT/*T. evansi* y/o MHCT. Se estima una semana o quince días de duración para completar este primer paso, según la explotación, de acuerdo a que el manejo en cada una de ellas es distinto.
- Establecer una pauta profiláctica frente a ectoparásitos, de acuerdo a los productos comerciales disponibles, para disminuir en la medida de lo posible la incidencia de la enfermedad debido a la picadura de *Stomoxys* spp. Aplicar producto en cada uno de los animales de la explotación durante la primera revisión. Repetir aplicación de acuerdo al tiempo de acción indicado por el fabricante de dicho producto.
- Tratamiento de todos los animales que muestren reacción positiva al test serológico utilizado y/o muestren parasitemia a través de MHCT. Separación de seropositivos y/o parasitémicos del resto del colectivo, en la medida de lo posible.
- Se propone como protocolo terapéutico tres dosis de Cymelarsan<sup>®</sup> de 0,5 mg/kg de peso vivo, con un intervalo de aplicación de 15 días. Se estima un peso vivo de 400 kg. en hembras adultas y 600 kg. en machos adultos. Valorar el tratamiento con otras drogas frente a *T. evansi* disponibles.

- Inmediatamente antes del siguiente tratamiento (quincenal) se propone revisión a través de MHCT de los animales seropositivos y/o parasitémicos que han sido separados.
- Una vez finalizada la terapia de tres inyecciones de Cymelarsan<sup>®</sup>, continuar la vigilancia quincenal de estos individuos a través de MHCT. Si hay parasitemia revisar el protocolo establecido.
- Localizar animales crónicos e incidir en su control de forma que se minimicen sus posibilidades como reservorios. En los casos que procedan, valorar eutanasia en algunos animales crónicos que recidivan tras el tratamiento y puedan suponer un riesgo de infestación para el resto del colectivo.
- Cuando se complete el trabajo con los seropositivos y/o parasitémicos, realizar nuevas revisiones en los restantes individuos seronegativos de forma sistemática. En caso de detección de nuevos animales positivos, aplicar protocolo terapéutico, de separación y de revisión ya citados.
- Revisión serológica y parasitológica mensual o bimensual (a valorar según volumen de trabajo) de todo el colectivo en cada una de las explotaciones, para detectar posibles nuevos infestados. En este caso, aplicar protocolo terapéutico, de aislamiento y de revisión ya citados. En animales que ya han recibido tratamiento, valorar si existe reducción de la reacción al test serológico utilizado.
- Revisión de animales a transportar entre ambas explotaciones, realizándose tratamiento cuando corresponda.
- Especial atención y revisión de todos los animales con signos clínicos manifiestos (adelgazamiento progresivo, edema, anemia), a pesar de no mostrar resultados que evidencien la enfermedad a través de las pruebas diagnósticas utilizadas.
- Gestión adecuada de los cadáveres, y control de plagas en las explotaciones.
- Continuar la vigilancia de especies susceptibles en áreas aledañas.

## VII. RESUMEN/SUMMARY



## 1. Resumen

*Trypanosoma evansi* fue diagnosticado en dromedarios en los años noventa en Canarias, manteniéndose Gran Canaria a día de hoy como la única isla afectada del archipiélago. Dos hipótesis fueron propuestas para explicar la persistencia del parásito: pérdida de eficacia del tratamiento empleado o presencia de otras especies animales que podrían actuar como reservorio. Con el objetivo de investigar acerca de esta segunda posibilidad se planteó la presente Tesis Doctoral.

Para el diagnóstico de *T. evansi* en especies ganaderas (rumiantes y equinos) y en roedores silvestres se emplearon técnicas serológicas (CATT/*T. evansi*), parasitológicas (MHCT y frotis) y de biología molecular (PCR). Previamente a este estudio de campo, se realizó una comparación entre los métodos MHCT y PCR en caprinos infestados experimentalmente. Además se construyó una trampa Nzi para capturar y detectar los vectores potenciales responsables de la transmisión en la zona afectada.

Con el estudio experimental se validó la utilidad del MHCT en caprinos para emplearlo como método de elección en el diagnóstico de seropositivos. A través de los trabajos de campo realizados no se pudo comprobar parasitemia por *T. evansi* en ninguna de las especies muestreadas, a excepción de los camélidos. Sin embargo, en todas las especies ganaderas muestreadas se observaron reacciones serológicas, destacando especialmente los ovinos. En roedores silvestres no se mostraron reacciones serológicas frente a *T. evansi*, pero se detectó otro tripanosoma de interés en salud pública, *T. lewisi*. *Stomoxys calcitrans*, por otro lado, fue el único insecto hematófago capturado en el área afectada, siendo pues el vector potencial en esa área.

Como conclusiones no se pudo demostrar un reservorio claro en las especies ganaderas y fauna silvestre muestreada. Actualmente el protozoo se mantiene en la población de camellos, donde podrían estar los propios reservorios representados por individuos infestados crónicamente. A este respecto, de acuerdo a la biología del vector predominante, se podría explicar que no se haya difundido la enfermedad. Sin embargo, la presencia de ganado seropositivo aconseja continuar con la vigilancia.

## 2. Summary

*Trypanosoma evansi* was diagnosed in camels in the Canary Islands in the nineties and Gran Canaria remaining today as the only affected island of the Archipelago. Two hypotheses have been proposed to explain the persistence of the parasite: loss of efficacy of treatment used, or the presence of other species that could act as a reservoir. In order to investigate this second possibility was raised this doctoral thesis.

Serological (CATT/*T. evansi*), parasitological (MHCT and smears) and molecular biology (PCR) techniques were used for diagnosis of *T. evansi* in livestock species (ruminants and horses) and wild rodents. Prior to these field surveys, a comparison between PCR and MHCT was made in experimentally infected goats. Also, a Nzi trap was built to capture and detect main potential vectors responsible for the transmission of the disease in the affected area.

The experimental study validated the usefulness of MHCT in goats to use as a method of choice for the diagnosis of serological positive samples. Parasitemia by *T. evansi* could not be verified in any of the species sampled through field work. However, serological reactions were observed in all livestock species sampled, emphasizing especially the sheep. Rodents did not show any serological reactions against *T. evansi*, but it was detected *T. lewisi* in them, another trypanosome of public health interest. *Stomoxys calcitrans*, on the other hand, was the sole hematophagous insect trapped using the Nzi trap, and supposed the potential vector in the affected area.

As conclusions, a clear reservoir could not be demonstrated in cattle and wildlife species sampled. Currently, the protozoa are keeping in the camel population, which could be reservoirs themselves, represented by chronically infected individuals. In this regard, no spread of the disease could be explained according to the biology of the potential vector. However, surveillance is recommended given the presence of positive serological reactions in ruminant and equines.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA



**Abbas, A.K., Litchman A.H., 2003.** Inmunología celular y molecular 5ª Edición. S.A. Elsevier España. Madrid. 563 pp.

**Abdesalam, A.D., Delafosse, A., Elsen, P. Amsler-Delafosse, S., 2002.** Vecteurs potentiels de *Trypanosoma evansi* chez le dromadaire au Tchad oriental. Revue Élev. Méd. Vét. Pays Trop., 55: 21-30.

**Adl, S.M, Simpson A.G.B., Farmer, M.A., Andersen R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R. et al., 2005.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J. Eukaryot. Microbiol., 52: 399–451.

**AEMPS, 2011.** Centro de información on-line de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios. Acceso a Veterinaria. <http://www.aemps.es/> (último acceso: 29 de abril 2011).

**Al-Qarawi, A.A., Abdel-Rahman, H. Elmougy, S.A., 2001.** Impairment in the pituitary-thyroid axis of the *Camelus dromedarius* infected with *Trypanosoma evansi*. Dtsch. Tierarzt. Wochenschr., 108: 172-174.

**Al-Qarawi, A.A., Omar, H.M., Abdel-Rahman, H.A., El-Mougy, S.A., El-Belely, M.S., 2004.** Trypanosomiasis-induced infertility in dromedary (*Camelus dromedarius*) bulls: Changes in plasma steroids concentration and semen characteristics. Anim. Reprod. Sci., 84: 73-82.

**Allan, S.A., Day, J.F., Edman, J.D., 1987.** Visual ecology of biting flies. Ann. Rev. Entomol., 32: 297-316.

**Ameri, M., Wang, X., Wilkerson M. J., Kanost M. R., Broce A. B., 2008.** An Immunoglobulin Binding Protein (Antigen 5) of the Stable Fly (Diptera: Muscidae) Salivary Gland Stimulates Bovine Immune Responses. J. Med. Entomol., 45: 94–101.

**Anadón A., Matínez-Larrañaga, M.R., 2008.** Fármacos antiparasitarios. En: Farmacología básica y clínica/Velázquez; (colaboradores), Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain I., Leza J.C., Moro M.A., Portolés A.-18ª ed.-Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana (2008), pp.893-918.

**Antoine-Moussiaux, N., Desmecht, D., 2008a.** Pathologie de l'infection par *Trypanosoma evansi*. Ann. Méd. Vét., 152: 94-102.

**Antoine-Moussiaux, N., Desmecht, D., 2008b.** Epidémiologie de l'infection par *Trypanosoma evansi*. Ann. Méd. Vét., 152: 191 -201.

**Antoine-Moussiaux N, Büscher P, Desmecht D., 2009.** Host-parasite interactions in trypanosomiasis: on the way to an antidisease strategy. Infect. Immun., 77: 1276-1284.

**Aquino, L.P.C.T. de, Machado, R.Z., Alessi, A.C., Marques, L.C., De Castro, M.B., Malheiros, E.B., 1999.** Clinical, Parasitological and Immunological Aspects of Experimental Infection with *Trypanosoma evansi* in Dogs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94: 255-260.

**Aquino, L.P.C.T., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Santana, A.E., Castro, M.B., Marques, L.C. et al., 2002.** Hematological, biochemical and anatomopathological aspects of the experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 54: 8-18.

**Arias de Marín de Cubas, T. 1986.** Historia de las siete islas de Canaria/ edición de Angel de Juan Casañas y María Régulo Rodríguez ; proemio de Juan Régulo Pérez ; notas arqueológicas de Julio Cuenca Sanabria. Las Palmas de Gran Canaria: Real Sociedad de Amigos del País de Gran Canaria. Libro primero, capítulo XI. pp. 101-106.

**Arjona Saz, A., 2007.** Células implicadas en la respuesta inmune. En: Manual de Inmunología Veterinaria. Gómez-Lucía E, Blanco MM y Doménech A (eds.). Pearson-Prentice Hall. Madrid. pp. 41-62.

**Atarhouch, T., Rami, M., Bendahman, M.N., Dakkak, A., 2003.** Camel trypanosomosis in Morocco 1: results of a first epidemiological survey. Vet. Parasitol., 111: 277-286.

**Audu, P.A., Esievo, K.A.N., Mohammed, G., Ajanusi, O.J., 1999a.** Studies of infectivity and pathogenicity of an isolate of *Trypanosoma evansi* in Yankasa sheep. Vet. Parasitol., 86: 185-190.

**Audu, P.A., Esievo, K.A.N., Mohammed, G., Ajanusi, O.J., Ibrahim, N. D. G., 1999b.** Pathological observations in *Trypanosoma evansi* infected Yankasa sheep. J. Protozool. Res., 9: 64-70.

**Báez, M., 1981.** Dípteros de Canarias. VII. "Muscinae (Dipt., Muscidae)". Vieraea: Folia scientiarum biologicarum canariensium. Santa Cruz de Tenerife: Organismo Autónomo Complejo Insular de Museos y Centros del Cabildo de Tenerife. Vol. 11 (1981), nº 1-2 (marzo 1982), pp.171-192.

**Báez, M., García, A. 2004.** Orden Diptera. En: Izquierdo, I., J. L. Martín, N. Zurita y M. Arechavaleta (eds.) Lista de especies silvestres de Canarias (hongos, plantas y animales terrestres) 2004. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación Territorial, Gobierno de Canarias. pp. 261- 281.

**Báez, M., Portillo, M. 1981.** Los tabánidos de las Islas Canarias (Diptera, Tabanidae). Boletín de la Asociación Española de Entomología, pp. 87-91.

**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.

**Baral, T.N., Baetselier, P. de, Brombacher, F., Magez, S. 2007.** Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. J. Infect. Dis., 195: 1513-1520.

**Barman, D., Guha, C., Biswas, U., Roy, B., Pradhan, S., Aich, R., 2010.** Experimental trypanosomosis in laboratory animals. Environ. Ecol., 28: 425-428.

**Barros, A.T., 2001.** Seasonality and relative abundance of Tabanidae (Diptera) captured on horses in the Pantanal, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 96: 917-923.

**Barros, A.T.M., Foil, L.D., 2007.** The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. Vet. Parasitol., 144: 380-384.

**Basagoudanavar, S.H., Rao, J.R., Omanwar, S., Tiwari, A.K., Singh, R.K., Kataria, R.S. et al., 2001.** Identification of *Trypanosoma evansi* by DNA hybridisation using a non-radioactive probe generated by arbitrary primer PCR: short communication. Acta Vet. Hung., 49:191-195.

**Bautista C.R., Giles I., Montenegro N., Figueroa J.V., 2004.** Immunization of bovines with concealed antigens from *Haematobia irritans*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1026: 284-288.

**Bautista, C.R., Marín, A.P., Giles, I., 2007.** Efecto de la alimentación de *Stomoxys Calcitrans* (DIPTERA: MUSCIDAEE) con sangre de *Bos Taurus* inmunizado con antígenos ocultos de la mosca del establo, sobre la ovoposición. Vet. Mex., 38: 177-185.

**Bawm, S., Matsuura, H., Elkhateeb, A., Nabeta, K., Subeki, Nonaka N. et al., 2008.** In vitro antitrypanosomal activities of quassinoid compounds from the fruits of a medicinal plant, *Brucea javanica*. Vet. Parasitol., 158: 288-294.

**Bazolli, R.S., Marques, L.C., Machado, R.Z., Aquino, L.P.C., Alessi, A.C., Camacho, A.A., 2002.** Transmissão oral de *Trypanosoma evansi* em cães (Oral transmission of *Trypanosoma evansi* in dogs). Ars Veterinaria., 18: 148-152.

**Berlin, D., Loeb, E., Baneth, G., 2009.** Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. Vet. Parasitol., 161: 316-319.

**Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C. et al., 2005.** The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science, 309: 416-422.

**Biswas, R.K., Hunter, A.G., 1993.** Effect of stage of infection with *Trypanosoma evansi* on Cymelarsan therapy. Trop. Anim. Health Prod., 25: 223–224.

**Borst, P., Fase-Fowler, F., Gibson, W.C., 1987.** Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. Mol. Biochem. Parasitol., 23: 31-38.

**Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.R., 1998.** *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). Vet. Parasitol., 79: 95-107.

**Byers S.R., Kramer J. W., 2010.** Normal Hematology of Sheep and Goats. En: Weiss, D. J. y Wardrop, K., editores. Schalm's Veterinary Hematology. 6<sup>th</sup> ed. Iowa. Willey-Blackwell. 2010. pp.836-842.

**Cameron, A.R., Baldock, F.C., 1998.** A new probability formula for surveys to substantiate freedom from disease. Prev. Vet. Med., 34: 1-17.

**Carles-Tolrrá, M., Báez, M., 2002.** Hippoboscidae. En: Carles-Tolrrá Hjorth-Andersen, M. editor. Catálogo de los Díptera de España, Portugal y Andorra (Insecta). Zaragoza: Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA). 2002. p. 208.

**Chansiri, K., Khuchareontaworn, S., Sarataphan, N., 2002.** PCR-ELISA for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in animals and vector. Mol. Cell. Probes, 16: 173-177.

**Claes, F., Verloo, D., De Waal, D.T., Majiwa, P.A., Baltz, T., Goddeeris, B.M. et al., 2003.** The expression of RoTat 1.2 variable surface glycoprotein (VSG) in *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*. Vet Parasitol., 116: 209-216.

**Claes, F., Radwanska, M., Urakawa, T., Majiwa, P. A., Goddeeris, B. M., Büscher, 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. <http://www.kinetoplastids.com/content/3/1/3>

**Cordero del Campillo, M., 2001.** “Problemas de la colonización de África”. VI<sup>as</sup> Jornadas Nacionales de Historia de la Veterinaria; 2001 Nov 16-17; Valencia, Spain. (ref. PGC 2000-2171-E)

**Cordero del Campillo, M., Martínez Fernández, A.R., 1999.** Sistemática, taxonomía y nomenclatura en parasitología. En: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA, coords. *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana; 1999. pp.55-62.

**Coronado A.J, Suárez C.E., Mujica F.F., Henríquez H.R., 2006.** Parasitoides enemigos naturales de la mosca de los establos, *Stomoxys calcitrans*, en una finca lechera del estado de Lara, Venezuela. *Veterinaria Trop.*, 31: 33-41.

**Correa-Salgado, A.M., Pacheco de Araujo, F.A., Cañón-Franco, W.A., 2010.** Infección natural por *Trypanosoma evansi* en canino, Manizales-Colombia: Caso clínico. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.*, 69: 99-100.

**Costa, M.M., Silva, A.S.D., Wolkmer, P., Zanette, R.A., França, R.T., Monteiro, S.G. et al., 2010.** Serum proteinogram of cats experimentally infected by *Trypanosoma evansi*. *Prev. Vet. Med.*, 95: 301-304.

**Crutzen, P.J., Aselmann, I., Seiler, R. W., 1986.** Methane production by domestic animals, wild ruminants, other herbivorous fauna, and humans. *Tellus* 388: 271-284.

**Cupp, M.S., Cupp, E.W., Navarre, C., Wisnewski, N., Brandt, K.S., Silver, G.M. et al., 2004.** Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. *Vaccine*, 22:2285-2297.

**Cupp, M.S., Cupp, E.W., Navarre, C., Zhang, D., Yue, X., Todd, L. et al., 2010.** Salivary Gland Thrombostasin Isoforms Differentially Regulate Blood Uptake of Horn Flies Fed on Control- and Thrombostasin-Vaccinated Cattle. *J. Med. Entomol.*, 47: 610-617.

**Cutuli de Simón, M.T., 2007.** Inmunidad innata. En: *Manual de Inmunología Veterinaria*. Gómez-Lucía E, Blanco MM y Doménech A (eds.). Pearson-Prentice Hall. Madrid. pp. 63-83.

**Da Silva, A.S., Ceolin, L.V., Oliveira, C.B., Monteiro, S.G., Doyle, R.L., 2007.** Infecção via oral por *Trypanosoma evansi* em animais de laboratório (Oral infection by *Trypanosoma evansi* in rats and mice). *Cienc. Rural* 37: 897-900.

**Da Silva, A.S., Costa, M.M., Lopes, S.T. dos A., Monteiro, S.G., 2008a.** Alterações hematológicas em coelhos infectados experimentalmente pelo *Trypanosoma evansi* (Hematological changes in rabbits experimentally infected by *Trypanosoma evansi*). *Cienc. Rural*, 38: 538-542.

**Da Silva, A.S., Costa, M.M., Doyle, R.L., Lopes, S.T. dos A., Monteiro, S.G., 2008b.** Experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rabbits. *Ciencia Animal Brasileira.*, 9: 519-523.

**Da Silva, A.S., Tochetto, C., Zanette, R.A., Pierezan, F., Rissi, D.R., Santurio, J. M., Monteiro, S.G., 2008c.** Diminazene aceturate and imidocarb dipropionate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in *Rattus norvegicus* experimentally infected. *Cienc. Rural*, 38: 1357-1362.

**Da Silva, A.S., Pereira, P. de L., Monteiro, S.G., 2009a.** Achados patológicos, sinais clínicos e ganho de peso de coelhos infectados experimentalmente por *Trypanosoma evansi* (Pathological findings, clinical signs and weight gain of naturally infected rabbits by *Trypanosoma evansi*). *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)*, 30: 679-682.

**Da Silva, A.S., Costa, M.M., Wolkmer, P., Zanette, R.A., Faccio, L., Gressler, L.T. et al., 2009b.** *Trypanosoma evansi*: hematologic changes in experimentally infected cats. *Exp. Parasitol.*, 123: 31-34.

**Da Silva, A.S., Hoehne, L., Tonin, A.A., Zanette, R.A., Wolkmer, P., Costa, M.M. et al., 2009c.** *Trypanosoma evansi*: levels of copper, iron and zinc in the bloodstream of infected cats. *Exp. Parasitol.*, 123: 35-38.

**Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Machado Costa, M.M., Paim, F., Belmonte Oliveira C., Adriel Zanette, R. et al., 2009d.** Lipid peroxidation in cats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitol. Res.*, 106: 157-161.

**Da Silva, A.S., Zanette, R.A., Otto, M.A., Gressler, L.T., de Lima Pereira, P., Monteiro, S.G., 2009e.** Aceturato de diminazeno no tratamento de equinos infectados naturalmente por *Trypanosoma evansi* no município de Cruz Alta-RS, Brasil. *Vet. e Zootec.*, 16: 74-79.

**Da Silva, A.S., Zanette, R.A., Wolkmer, P., Costa, M.M., Garcia, H.A., Lopes, S.T.A. et al., 2009f.** Diminazene aceturate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in cats. *Vet. Parasitol.*, 165: 47-50.

**Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Costa, M.M., Zanette, R.A., Oliveira, C.B., Soares, C.D.M. et al., 2010a.** Clinical aspects of cats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Comp. Clin. Pathol.*, 19: 85-89.

**Da Silva, A.S., Pierezan, F., Wolkmer, P., Costa, M.M., Oliveira, C.B., Tonin, A.A. et al., 2010b.** Pathological findings associated with experimental infection by *Trypanosoma evansi* in cats. *J. Comp. Pathol.*, 142: 170-176.

**Da Silva, A.S., Wolkmer, P., Costa, M.M., dos Anjos Lopes, S.T., Monteiro, S.G. 2010c.** Anemia in cats infected by *Trypanosoma evansi*. *Comp. Clin. Pathol.*, doi: 10.1007/s00580-010-1009-2.

**Da Silva, A.S., Spanevello, R., Stefanello, N., Wolkmer, P., Costa, M.M., Zanette, R. et al., 2010d.** Influence of *Trypanosoma evansi* in blood, plasma, and brain cholinesterase of experimentally infected cats. *Res. Vet. Sci.*, 88: 281-284.

**Da Silva, A. S., Wolkmer, P., Costa, M. M., Tonin, A. A., Eilers, T. L., Gressler, L. T. et al. 2010e.** Biochemical changes in cats infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.*, 171: 48-52.

**Da Silva, A.S., Monteiro, S.G., Gonçalves, J.F., Spanevello, R., Oliveira, C.B., Costa, M.M. et al., 2011.** Acetylcholinesterase activity and lipid peroxidation in the brain and spinal cord of rats infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.*, 175: 237-244.

**Dacks, J.B., Walker, G., Field, M.C., 2008.** Implications of the new eukaryotic systematics for parasitologists. *Parasitol. Int.*, 57: 97-104.

**Dakshinkar, N.P., Dhoot, V.M., Uphadhye, S.V., Bhojne, G.R., Sarode, D.B., Kolte, S.W., 2002.** Trypanosomiasis in a jungle cat. *Indian Vet. J.*, 79: 76-77.

**Damayanti, R., Graydon, R.J., Ladds, P.W., 1994.** The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). *J. Comp. Pathol.*, 110: 237-252.

**Dargantes, A.P., Reid, S.A., Copeman, D.B., 2005a.** Experimental *Trypanosoma evansi* infection in the goat. I. Clinical signs and clinical pathology. *J. Comp. Pathol.*, 133: 261-266.

**Dargantes, A.P., Campbell, R.S.F., Copeman, D.B., Reid, S.A., 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., Rae, P.F. et al., 1999.** Evaluation of antigen detection and antibody detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epidemiol. Infect.* 123: 149-155.

**De Oliveira, L.A.N., Santos, S.D., Herrera, H.M., Gama, C., Cupolillo, E., Jansen, A.M. et al., 2008.** *Trypanosoma evansi*: Molecular homogeneity as inferred by phenetical analysis of ribosomal internal transcribed spacers DNA of an eclectic parasite. *Exp. Parasitol.*, 118: 402-407.

**De Souza, W., da Cunha-e-Silva, N.L., 2003.** Cell fractionation of parasitic protozoa: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 98:151-170.

**De Souza, W., 2008.** An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr. Pharm. Des.*, 14: 822-838.

**Deborggraeve, S., Koffi, M., Jamonneau V., Bonsu F.A., Queyson R., Simarro P.P. et al., 2008.** Molecular analysis of archived blood slides reveals an atypical human *Trypanosoma* infection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 61: 428–433.

**Desquesnes, M., Ravel, S., Cuny, G., 2002.** PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* 1,2. <http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/2>.

**Desquesnes, M., 2004.** Livestock Trypanosomoses and their vectors in Latin America. OIE (World organisation for animal health). Paris, Francia. 174 pp.

**Desquesnes, M., Bossard, G., Patrel, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E. et al., 2008.** First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France. *Vet. Rec.*, 162: 750-752.

**Desquesnes, M., Kamyngkird, K., Pruvot, M., Kengradomkij, C., Bossard, G., Sarataphan, N. et al., 2009a.** Antibody-ELISA for *Trypanosoma evansi*: application in a serological survey of dairy cattle, Thailand, and validation of a locally produced antigen. *Prev. Vet. Med.*, 90: 233-241.

**Desquesnes, M., Bossard, G., Thévenon, S., Patrel, D., Ravel, S., Pavlovic, D. et al., 2009b.** 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.

**Dia, M.L., Van Meirvenne, N., Magnus, E., Luckins, A. G., Diop, C., Thiam, A. et al., 1997a.** Evaluation de quatre 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. *Revue Élev. Vét. Pays trop.*, 50: 29-36.

**Dia, M.L., Diop, C., Aminetou, M., Jacquiet, P., Thiam, A., 1997b.** Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* in camels in Mauritania. *Vet. Parasitol.*, 72: 111-120.

**Dia, M.L., Diop, C., Thiam, A., Aminetou, M., Jacquiet, P., 1997c.** Importance of camel trypanosomosis and its vectors in Mauritania. *J. Camel Pract. Res.*, 4: 271-276.

**Dia M.L., Aminetou M., Diop C., Thiam A., Jacquiet P., Mabrouk E., 1997d.** Auto-guérison chez un chamelon (*Camelus dromedarius*) expérimentalement infecté par *Trypanosoma evansi* (Self cure of *Trypanosoma evansi* experimental infection in a young camel (*Camelus dromedarius*)). *Rev. Med. Vet.*, 148: 713-716.

**Dia, M.L., Jacquet, P., Chollet, J.Y., Diop, C., Thiam, A., Aminétou, M. et al., 2000.** Ten years of research activities on tropical parasitology of dromedaries, cattle, and small ruminants in Mauritania. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 916: 404-409.

**Diall, O., Bajyana Songa, E., Magnus, E., Kouyate, B., Diallo, B., Van Meirvenne, N. et al., 1994.** Evaluation d'un test sérologique d'agglutination directe sur carte dans le diagnostic de la trypanosomose caméline à *Trypanosoma evansi*. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.*, 13: 793-800.

**Dobson, R.J., Dargantes, A.P., Mercado, R.T., Reid S.A., 2009.** Models for *Trypanosoma evansi* (surra), its control and economic impact on small-hold livestock owners in the Philippines. *Int. J. Parasitol.*, 39:1115-1123.

**Dsouli Aymes, N., Mavoungou, J.F., De Stordeur, E., Duvallet, G., 2009.** Landscape, population structure and genetic diversity of *Stomoxys calcitrans*. *Parasite*, 16:37-41.

**Dye, C., 1992.** The analysis of parasite transmission by bloodsucking insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 1-19.

**Eisler, M.C., Dwinger, R.H., Majinwa, P.A.O., Picozzi, K., 2004.** Diagnosis and Epidemiology of African Animal Trypanosomiasis. In: Maudlin.I. Holmes P.H. and Miles.M.A., editores. *The Trypanosomiasis*. Wallingford: CABI publishing. 2004. p.253-268.

**El-Metanawey, T.M., El-Beih, N.M., El-Aziz, M.M., Hassanane, M.S., El-Aziz, T.H., 2009.** Comparative studies on diagnosis of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected goats. *Global Veterinaria*, 3: 348-353.

**El-Rayah, I.E., El-Malik, K.H., 2006.** Characterization of quinapyramine (TrypacideReg.) drug-resistant *Trypanosoma evansi*. *Afr. J. Biotechnol.*, 5: 951-955.

**Enwezor, F.N.C., Sackey, A.K.B., 2005.** Camel trypanosomosis-a review. *Vet. Arch* 75: 439-452.

**Estadística Agraria de Canarias 2009.** [www.gobcan.es](http://www.gobcan.es)

**Eyles, D.E., 1952.** Incidence of *Trypanosoma lewisi* and *Hepatozoon muris* in the norway rat. *J. Parasitol.*, 38: 222-225.

**Fabelo, F., 2008.** Historia y economía de la ganadería local. Introducción histórica del camello en Canarias. En: Schulz U. *El camello en Lanzarote*. Lanzarote: ADERLAN; 2008. pp. 47-64.

**Fernández, D., González-Baradat, B., Eleizalde, M., González-Marcano, E., Perrone, T., Mendoza, M., 2009.** *Trypanosoma evansi*: a comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Exp. Parasitol.*, 121: 1-7.

**Foil, L. D., 1989.** Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitol. Today*, 5: 88-96.

**Fowler, M. E., 2010.** Chapter 8: Parasites. En: Fowler, M. E. *Medicine and Surgery of Camelids*. Iowa: Wiley-Blackwell. 2010. pp. 231-269.

**Franciscato, C., Lopes, S.T.A., Teixeira M. M. G., Monteiro S. G., Wolkmer P., Garmatz B. C. et al., 2007.** Dog naturally infected by *Trypanosoma evansi* in Santa Maria, RS, Brasil. *Cienc. Rural*, 37: 288-291.

**Franke, C.R., Greiner, M., Mehlitz, D., 1994.** Monitoring of clinical, parasitological and serological parameters during an experimental infection of cabybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) with *Trypanosoma evansi*. *Acta Trop.*, 58: 171-174.

**Ghorui, S.K., Srivastava, R. V. N., 1999.** *Trypanosoma evansi*: immunochemical studies of variant surface glycoprotein. *Indian J. Anim. Sci.*, 69: 750-752.

**Gibson, G., Torr, S.J., 1999.** The responses of haematophagous Diptera to physical and olfactory host stimuli. *Med. Vet. Entomol.*, 13: 2-23.

**Gibson W., 2002.** Epidemiology and diagnosis of African trypanosomiasis using DNA probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 96 S1: 141-143.

**Gill, B.S., 1977.** Trypanosomes and Trypanosomiasis of Indian Livestock. Indian Council of Agriculture Research (ICAR), New Delhi, ICAR, pp. 21-23.

**Gilles, J., David, J.F., Duvallet, G., De La Rocque, S., Tillard, E., 2007.** Efficiency of traps for *Stomoxys calcitrans* and *Stomoxys niger niger* on Reunion Island. *Med. Vet. Entomol.*, 21: 65-69.

**Gillingwater, K., Büscher, P., Brun, R., 2007.** Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. *Vet. Parasitol.*, 148: 114-121.

**Gillingwater, K., Kumar, A., Anbazhagan, M., Boykin, D. W., Tidwell, R. R., Brun, R., 2009.** In vivo investigations of selected diamidine compounds against *Trypanosoma evansi* using a mouse model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53: 5074-5079.

**Gillingwater, K., Kumar, A., Ismail, M.A., Arafa, R.K., Stephens, C.E., Boykin, et al., 2010.** In vitro activity and preliminary toxicity of various diamidine compounds against *Trypanosoma evansi*. Vet. Parasitol., 169: 264-272.

**Gebreyohans, G., Gangwar, S.K., 2010.** Serological detection of *Trypanosoma evansi* in small ruminants at Dodola and Assassa districts of Arsi-Bale high lands of Ethiopia. I.J.S.N. 1: 279-282.

**Griffin, L., 1978.** African trypanosomosis in sheep and goats: a review. Vet. Bull., 48: 819-825.

**Grondin T.M., Dewitt, S.F., 2010.** Normal hematology of the horse and donkey. En: Weiss, D. J. y Wardrop, K., editores. Schalm's Veterinary Hematology. 6<sup>th</sup> ed. Iowa. Willey-Blackwell. 2010. pp.821-828.

**Gull, K., 2001.** The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and postgenomics. Int. J. Parasitol., 31: 443-452.

**Gutiérrez, C., Montoya, J.A., Padrón, M., Corbera, J.A., Juste M.C., Molina J.M., 1998.** Descripción de un caso de tripanosomosis en el dromedario por *T. evansi* en Canarias. Med. Vet., 15: 356-357.

**Gutierrez, C., Juste, M.C., Corbera, J.A., Magnus, E., Verloo, D., Montoya, J.A., 2000.** Camel trypanosomosis in the Canary Islands: assessment of seroprevalence and infection rates using the card agglutination test (CATT/*T. evansi*) and parasite detection tests. Vet. Parasitol., 90: 155-159.

**Gutiérrez, C., Corbera, J.A., Morales, M., Büscher, P., 2004a.** Performance of serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally inoculated goats. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1026: 152-153.

**Gutiérrez C., Corbera, J.A., Doreste F., Büscher, P., 2004b.** Use of the miniature anion exchange centrifugation technique to isolate *Trypanosoma evansi* from goats. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1026: 149-151.

**Gutiérrez, 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. Parasitol., 130: 163-168.

**Gutiérrez, C., Corbera, J.A., Morales, M., Büscher, P., 2006a.** Trypanosomosis in goats: current status. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1081:300-310.

**Gutierrez, C., Corbera, J.A., Juste, M.C., Doreste, F., Morales, I., 2006b.** Clinical, hematological, and biochemical findings in an outbreak of abortion and neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1081: 325-327.

**Gutiérrez , C., Corbera, J.A., Bayou, K., Van Gool, F., 2008.** Use of cymelarsan in goats chronically infected with *Trypanosoma evansi*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1149: 331-333.

**Gutiérrez, C., Desquesnes, M., Touratier, L., Buscher, P., 2010.** *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. Vet. Parasitol., 174: 26-29.

**Hall, M.J., Wall, R., 2004.** Biting flies: their role in the mechanical transmission of trypanosomes to livestock and methods for their control. In: Maudlin.I. Holmes P.H. and Miles.M.A., editores. The Trypanosomiasis. Wallingford: CABI publishing. 2004. pp.583-594.

**Hampl, V., Hug, L., Leigh, J.W., Dacks, J.B., Lang, B.F., Simpson, A.G.B. et al., 2009.** Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 106: 3859-3864.

**Hassan, M., Muhammad, G., Gutierrez, C., Iqbal, Z., Shakoor, A., Jabbar, A., 2005.** Evaluation of different diagnostic tests for *Trypanosoma evansi* infection among horses and camels in the Punjab Region, Pakistan. J. Camel Pract. Res., 12: 95-97.

**Hellebrekers L. J., Slappendel R.J., 1982.** Trypanosomiasis in a dog imported in The Netherlands. Vet. Q., 4: 182-186.

**Herrera, L., Urdaneta-Morales, S., 1997.** Synanthropic rodent reservoirs of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in the valley of Caracas, Venezuela. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 39: 279-282.

**Herrera, H. M., Aquino L. P. C. T., Menezes R. F., Marques L. C., Moraes, M. A. V. Werther K. et al., 2001.** *Trypanosoma evansi* experimental infection in the South American coati (*Nasua nasua*): clinical, parasitological and humoral immune response. Vet. Parasitol., 102: 209-216.

**Herrera, H.M., Dávila, A.M.R., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., D'Andrea, P.S. et al., 2004.** Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. Vet. Parasitol., 125: 263-275.

**Herrera, H.M., Abreu, U.G., Keuroghlian, A., Freitas, T.P., Jansen, A.M., 2008.** The role played by sympatric collared peccary (*Tayassu tajacu*), white-lipped peccary (*Tayassu pecari*), and feral pig (*Sus scrofa*) as maintenance hosts for *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma cruzi* in a sylvatic area of Brazil. *Parasitol Res.*, 103(3): 619-624.

**Hilali, M., Abdel-Gawad, A., Nassar, A., Abdel-Wahab, A., 2006.** Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.*, 139: 237-243.

**Hoare, C.A., 1954.** The loss of the kinetoplast in trypanosomes, with special reference to *Trypanosoma evansi*. *J. Protozool.*, 1: 28-33.

**Hoare, C.A., 1965.** Vampire bats as vectors and host of equine and bovine trypanosomes. *Acta Trop.*, 22: 204-216.

**Hoare, C.A., 1972.** The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, 749 pp.

**Holland, W. G., Claes, F., My, L. N., Thanh, N. G., Tam, P. T., Verloo, D. et al., 2001.** A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet. Parasitol.*, 97: 23-33.

**Holland, W. G., Do, T. T., Huong, N. T., Dung, N. T., Thanh, N. G., Vercruyse, J. et al., 2003.** The effect of *Trypanosoma evansi* infection on pig performance and vaccination against classical swine fever. *Vet. Parasitol.*, 111: 115-123.

**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.

**Holmes, P.H., Eisler, M.C., Geerts, S., 2004.** Current chemotherapy of Animal Trypanosomiasis. In: Maudlin.I. Holmes P.H. and Miles.M.A., editores. The Trypanosomiasis. Wallingford: CABI publishing. 2004. pp. 431-444.

**Howie S, Guy M, Fleming L, Bailey W, Noyes H, et al., 2006.** A Gambian Infant with Fever and an Unexpected Blood Film. *PLoS Med* 3(9): e355. doi:10.1371/journal.pmed.0030355

**Ijaz, M.K., Nur-E-Kamal, M.S., Mohamed, A.I., Dar, F.K., 1998.** Comparative studies on the sensitivity of polymerase chain reaction and microscopic examination for the detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected mice. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 21: 215-223.

**Indrakamhang, P., 1998.** *Trypanosoma evansi* infection in livestock in Thailand. J. Protozool. Res., 8: 153-161.

**Itard, J., 1989.** African Animal Trypanosomoses. In: Manual of Tropical Veterinary Parasitology. English Edition. CAB International. Wallingford, 1989. pp. 179-293.

**Jacquet, P., Cheikh, D., Thiam, A., Dia, M.L., 1993.** La trypanosomose à *Trypanosoma evansi* (Steel 1885), Balbiani 1888 chez les petits ruminants de Mauritanie: Résultats d'inoculation expérimentale et d'enquêtes sur le terrain. Revue Élev. Vét. Pays trop., 46: 574-578.

**Jain, N.C., 1986.** Schalm's Veterinary Hematology, fourth ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

**Jittapalapong, S., Inpankaew, T., Sarataphan, N., Herbreteau, V., Hugot, J.P., Morand, S. et al., 2008.** Molecular detection of divergent trypanosomes among rodents of Thailand. Infect. Genet. Evol., 8: 445-449.

**Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R. et al., 2005.** Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. Am. J. Trop. Med. Hyg., 73: 491-495.

**Joshi P.P., Chaudhari A., Shegokar V.R., Powar R.M., Dani V.S., Somalwar A.M. et al., 2006.** Treatment and follow-up of the first case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 100: 989-991.

**Juste, M.C., 2000.** Diagnóstico y prevalencia de la tripanosomosis por *T. evansi* en el dromedario en Canarias. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

**Kageruka, P., Mortelmans, J., 1971.** Isolement de *Trypanosoma evansi* Steel 1885 d'un cabiai (\*) (*Hydrochoerus hydrochoeris* Lin.) importé en Belgique et étude préliminaire de sa virulence. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 51: 709-716.

**Kartman, L., 1954.** Observations on *Trypanosoma lewisi* and *Grahamella* sp. in the blood of rats from Hamakua district, Island of Hawaii. J. Parasitol., 40: 571-579.

**Kaur, R., Gupta, V.K., Dhariwal, A.C., Jain, D.C., Shiv, L., 2007.** A rare case of trypanosomiasis in a two month old infant in Mumbai, India. J. Commun. Dis., 39: 71-74.

**Kettle, D.S., 1995.** Medical and Veterinary Entomology. Wallingford: CAB international. 1995. pp. 211-247.

**Kohl L., Gull K., 1998.** Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 93: 1-9.

**Konnai, S., Mekata, H., Mingala, C. N., Abes, N. S., Gutierrez, C. A., Herrera, J. R. V. et al., 2009.** Development and application of a quantitative real-time PCR for the diagnosis of Surra in water buffaloes. *Infect. Genet. Evol.*, 9: 449-452.

**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.

**Lai D-H., Wang Q-P, Li Z., Lukes J., Lun, Z-R., 2009.** Evolution of the serum resistance-associated SRA gene in African trypanosomes. *Chin. Sci. Bull.*, 54: 1275-1278.

**Lai, D-H., Wang, Q-P, Li, Z., Luckins, A.G., Reid, S.A., Lun, Z-R., 2010.** Investigations into human serum sensitivity expressed by stocks of *Trypanosoma brucei evansi*. *Int. J. Parasit.*, 40: 705-710.

**Lanham S.M., Godfrey D.G., 1970.** Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.*, 28: 521-534.

**Latif, B.M.A., Kadhim, F.S., Jassim, F.K., 1986.** Congenital transmission of *Trypanosoma evansi* in laboratory animals. *J. Biol. Sci. Res.*, 17: 99-105.

**Lemos, K.R., Marques, L.C., Aquino, L.P.C.T., Alessi, A.C., Zacarias, R.Z., 2008.** Astrocytic and microglial response and histopathological changes in the brain of horses with experimental chronic *Trypanosoma evansi* infection. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 50: 243-249.

**Levine, N.D., Watrach, A.M., Kantor, S., Hardenbrook, H.J., 1956.** A case of bovine trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* in Illinois. *J. Parasitol.*, 42: 533.

**Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M. et al., 1980.** A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.*, 27: 37-58.

**Li, S.-Q., Fung, M.-C., Reid, S.A., Inoue, N., Lun, Z.-R., 2007.** Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. *Parasite Immunol.*, 29: 191-199.

**Li, S.Q., Yang, W.B., Ma, L.J., Xi, S.M., Chen, Q.L., Song, X.W., et al., 2009.** Immunization with recombinant actin from *Trypanosoma evansi* induces protective immunity against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection. *Parasitol Res.*, 104: 429-35.

**Linhart, S.B., Flores Crespo, R., Mitchell, G.C., 1972.** Control of vampire bats by topical application of an anticoagulant, Chlorophacinone. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 6: 31-38.

**Liu, N., Zhuang, S., 2011.** Tissue Protective and Anti-Fibrotic Actions of Suramin: New Uses of an Old Drug. *Curr. Clin. Pharmacol.*, 6: 137-142.

**Luckins, A.G., Gray, A.R., Rae, P., 1978.** Comparison of the diagnostic value of serum immunoglobulin levels, an enzyme-linked immunosorbent assay and a fluorescent antibody test in experimental infections with *Trypanosoma evansi* in rabbits. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 72: 429-441.

**Luckins A.G., 1988.** *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol Today*, 4:137-142.

**Luckins A., Dwinger H., 2004.** Non-tsetse-transmitted Animal Trypanosomiasis. In: Maudlin.I. Holmes P.H. and Miles.M.A., editores. *The Trypanosomiasis*. Wallingford: CABI publishing. 2004. pp. 269-282.

**Li S.-Q., Fung M.-C., Reid S.A., Inoue N., Lun Z.-R., 2007.** Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. *Parasite Immunol.* 29: 191-199.

**Luckins, A.G., 1988.** *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today*, 4: 137-142.

**Luckins A., Dwinger H., 2004.** Non-tsetse-transmitted Animal Trypanosomiasis. In: Maudlin.I. Holmes P.H. and Miles.M.A., editores. *The Trypanosomiasis*. Wallingford: CABI publishing. 2004. p.269-282.

**Lun, Z.-R., Brun, R., Gibson, W., 1992.** Kinetoplast DNA and molecular karyotypes of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* from China. *Mol. Bioch. Parasitol.*, 50: 189-196.

**Lun, Z-R., Desser, S.S., 1995.** Is the broad range of host and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA?. *Parasitol. Today*, 11: 131-133.

**Lun, Z.-R., Li, A.-X., Chen, X.-G., Lu, L.-X., Zhu, X.-Q., 2004.** Molecular profiles of *Trypanosoma brucei*, *T. evansi* and *T. equiperdum* stocks revealed by the random amplified polymorphic DNA method. *Parasitol. Res.*, 92: 335-340.

**Lun, Z.-R., Reid, S. A., Lai, D.-H., Li, F.-J., 2009.** Atypical human trypanosomiasis: a neglected disease or just an unlucky accident? *Trends Parasitol.*, 25: 107-108.

**Magnus, E. Vervoort T, Van Meirvenne N., 1978.** A card agglutination test with stained trypanosomes (CATT) for the serological diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.*, 58: 169-176.

**Mahmoud, M.M., Gray A.R., 1980.** Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (Steel, 1885) Balbiani, 1888. A review of recent research. *Trop. Anim. Health Prod.*, 12: 35-47.

**Mandal, M., Laha, R., Sasmal, N.K., 2008.** First report of establishment of *Trypanosoma evansi* infection in pigeon nestlings (*Columba livia*). *J. Parasitol.*, 94: 1428-1429.

**Manohar, B.M., Selvaraj, J., Jayathangaraj, M.G., Khan, P.N., 2003.** Pathology of *Trypanosoma evansi* infection in a tiger. *Indian Vet. J.*, 80: 505-507.

**Marques, L.C., Machado, R.Z., Alessi, A.C., Aquino, L.P.C.T., Pereira, G.T., 2000.** Experimental infection with *Trypanosoma evansi* in horses: clinical and haematological observations. *Brazil J. Vet. Parasitol.*, 9: 11-15.

**Masiga, D. K., Gibson, W. C., 1990.** Specific probes for *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 40: 279-283.

**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.

**McGeary, R.P., Bennett, A.J., Tran, Q.B., Cosgrove K.L., Ross B.P., 2008.** Suramin: clinical uses and structure-activity relationships. *Mini. Rev. Med. Chem.*, 8: 1384-1394.

**Mehlhorn. H. (ed.), 2001.** Encyclopedic reference of parasitology: Diseases, treatment, therapy. 2nd ed. Berlin: Springer; 2001. pp. 563-641.

**Mekata, H., Konnai, S., Witola, W. H., Inoue, N., Onuma, M., Ohashi, K., 2009.** Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. *Infect. Genet. Evol.*, 9: 1301-1305.

**Mihok, S., Maramba, O., Munyoki, E., Kagoiya, J., 1995.** Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). Trop. Med. Parasitol., 46: 103-105.

**Mihok S., 2002.** The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. Bull Entomol Res., 92: 385-403.

**Misra, K.K., Ghosh, M., Choudhury, A., 1976.** Experimental transmission of *Trypanosoma evansi* to chicken. Acta Protozool., 15: 381-386.

**Molina, J.M., Ruiz, A., Juste, M.C., Corbera, J.A., Amador, R, Gutiérrez, C., 2000.** Seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in dromedarios (*Camelus dromedarius*) from the Canary Islands (Spain) using an antibody Ab-Elisa. Prev. Vet. Med., 47: 53-59.

**Monzón, C.M., Mancebo O.A., Roux J.P., 1990.** Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. Vet. Parasitol., 36: 141-146.

**Monzón, C.M., Jara, A., Nantulya, V.M., 1995.** Sensitivity of antigen ELISA test for detecting *Trypanosoma evansi* antigen in horses in the subtropical area of Argentina. J Parasitol., 81: 806-808.

**Monzon, C.M., 2006.** Caracterización de un anticuerpo monoclonal dirigido contra *Trypanosoma evansi* y su aplicación en la detección de antígenos circulantes. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz., 25: 1067-1074.

**Morales, I., de León, M., Morales, M., Dalla, F., Gutierrez, C., 2006.** Ocular lesions associated with *Trypanosoma evansi* in experimentally infected goats. Vet. Parasitol., 141: 325-329.

**Morty, R.E., Pellé, R., Vadász, I., Uzcanga, G.L., Seeger, W., Bubis, J., 2005.** Oligopeptidase B from *Trypanosoma evansi*: A parasite peptidase that inactivates atrial natriuretic factor in the bloodstream of infected hosts. J. Biol. Chem., 280:10925-10937.

**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.

**Moutia, A., 1928.** Surra in Mauritius and its Principal Vector, *Stomoxys nigra*. Bull. Entomol. Res., 19: 211-216.

**Muhammad, G., Saqib, M., Sajid, M.S., Naureen, A., 2007.** *Trypanosoma evansi* infections in Himalayan black bears (*Selenarctos thibetanus*). *J. Zoo Wildl. Med.*, 38: 97-100.

**Murray, M., Murray, P.K., McIntyre, W.I., 1977.** An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71: 325-326.

**Muzari, M.O., Skerratt, L.F., Jones, R.E., Duran, T. L., 2010.** Alighting and feeding behaviour of tabanid flies on horses, kangaroos and pigs. *Vet Parasitol.*, 170: 104-111.

**Nantulya, V.M., Lindqvist, K. J., Diall, O., Olaho-Mukani., 1989.** Two simple antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Trop. Med. Parasitol.*, 40: 415-418.

**Navarrete I., Acosta I., 1999.** Tripanosomosis. Parasitosis Hemáticas. En: Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez FA, coords. *Parasitología veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill/Interamericana; 1999. pp. 302-309.

**Ngaira, J.M., Bett, B., Karanja, S.M., Njagi, E.N.M., 2003.** Evaluation of antigen and antibody rapid detection tests for *Trypanosoma evansi* infection in camels in Kenya. *Vet. Parasitol.*, 114: 131-141.

**Ngaira, J. M., Njagi, E. N. M., Ngeranwa, J. J. N., Olembo, N. K. 2004.** PCR amplification of RoTat 1.2 VSG gene in *Trypanosoma evansi* isolates in Kenya. *Vet Parasitol.*, 120: 23-33.

**Ngaira, J.M., Olembo, N.K., Njagi, E.N.M., Ngeranwa, J.J.N., 2005.** The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.*, 110: 30-38.

**Ngeranwa, J.J., Mutiga, E.R., Agumbah, G.J., Gathumbi, P.K., Munyua, W.K., 1991.** The effects of experimental *Trypanosoma* (Trypanozoon) (*brucei*) *evansi* infection on the fertility of male goats. *Vet. Res. Commun.*, 15: 301-308.

**Ngeranwa, J.J.N., Gathumbi, P.K., Mutiga, E.R., Agumbah, G.J.O., 1993.** Pathogenesis of *Trypanosoma (brucei) evansi* in small East African goats. *Res. Vet. Sci.*, 54: 283-289.

**Ngeranwa, J.J., Kilalo, D.C., 1994.** The ability of *Stomoxys calcitrans* and mechanical means to transmit *Trypanosoma (brucei) evansi* from goats to camels in Kenya. *Vet. Res. Commun.*, 18: 307-312.

**Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Ndung'u, J.M., Robertson, I., Okaye, S., Thompson, R.C.A. et al., 2004.** Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. *evansi* tests in Kenya. *Vet. Parasitol.*, 124: 187-199.

**Njiru, Z.K., Ouma, J.O., Enyaru, J.C., Dargantes, A.P., 2010.** Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for detection of *Trypanosoma evansi* strain B. *Exp. Parasitol.*, 125: 196-201.

**Nok, A.J., 2003.** Arsenicals (melarsoprol), pentamidine and suramin in the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol. Res.*, 90: 71–79.

**Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. et al., 2000.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl. Acids Res.*, 28: e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63

**NTTAT, 2009.** Report of the Meeting of the OIE *ad hoc* group on diagnostic tests for trypanosomoses. Paris, 30 March- 1 April 2009. En: Report of the Meeting of the OIE Biological Standards Commission. Paris, 15-17 September 2009. pp. 17-25.

**OIE, 2009.** *Trypanosoma evansi* Infections (including surra). En: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals pp. 352–360. [www.oie.int](http://www.oie.int). (último acceso: 15 de diciembre 2009).

**OIE, 2010.** *Trypanosoma evansi* Infections (including surra). En: Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals. [www.oie.int](http://www.oie.int) (último acceso: 22 de diciembre 2010).

**OIE, 2011.** [www.oie.int](http://www.oie.int) (último acceso: 20 junio de 2011).

**Olmeda, A.S., San Miguel, J.M., Luzón, M., 2001.** Primera denuncia de *Trypanosoma (Megatrypanum)* en ciervos (*Cervus elaphus*) de la Península Ibérica. *Galemys* 13 (nº especial): 149-153.

**OMS, 1996.** Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: medicamentos utilizados en enfermedades parasitarias. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, segunda edición; 1996, 156 pp. ISBN 92 4 340104 1

**OMS, 2007.** Report of the global partners' meeting on the neglected tropical diseases. A turning point 2007. Geneva, Switzerland 19-20 April 2007.

**Onah, D.N., Hopkins, J., Luckins, A.G., 1996.** Haematological changes in sheep experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Parasitol. Res.*, 82: 659-653.

**Onah, D.N., Hopkins, J., Luckins, A.G., 1998a.** Induction of CD4+CD8+ double positive T cells and increase in CD5+ B cells in efferent lymph in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. Parasite Immunol., 20: 121-134.

**Onah, D.N., Hopkins, J., Luckins, A. G., 1998b.** Increase in CD5<sup>+</sup> B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. Vet. Immunol. Immunopathol., 63: 209-222.

**Onah, D.N., Hopkins, J., Luckins, A.G., 1999.** Changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations and parasite-specific antibody responses in *Trypanosoma evansi* infection of sheep. Parasitol. Res., 85: 263-269.

**Otto M.A., da Silva A.S., Gressler L.T., Dall'Agnol L.P., Bottam J., Zanette R.A. et al., 2011.** *Trypanosoma evansi*: therapy with human plasma in infected rats. Comp. Clin. Pathol., 20:139-141.

**Ouma, J.O., Olaho-Mukani, W., Wishitemi, B.E.L., Guya, S.O., 1997.** Changes in classical pathway complement activity in dromedary camels experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. Vet. Immunol. Immunopathol., 57:135-140.

**Oyieke, F.A., Reid, G., 2003.** The mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* by *Haematobia minuta* (Diptera: Muscidae) and *Hippobosca camelina* (Diptera: Hippoboscidae) from an infected camel to a mouse and the survival of trypanosomes in fly mouthparts and gut (a preliminary record). Folia Vet., 47: 38-41.

**Pathak, K.M.L., Singh, Y., Meirvenne, N.V., Kapoor, M., 1997.** Evaluation of various diagnostic techniques for *Trypanosoma evansi* infections in naturally infected camels. Vet. Parasitol., 69: 49-54.

**Pathak, K.M.L., Kapoor, M., 1999.** Transplacental transmission of *Trypanosoma evansi* in a donkey. Indian Vet. J., 76: 179.

**Payne, R.C., Sukanto, I.P., Partoutomo, S., Polytedi, F., 1992.** Experimental infection of Friesian Holstein calves with an Indonesian isolate of *Trypanosoma evansi*. Trop. Med. Parasitol., 43: 115-117.

**Payne, R.C., Sukanto, I.P., Bazeley, K., Jones, T.W., 1993.** The effect of *Trypanosoma evansi* infection on the oestrous cycle of Friesian Holstein heifers. Vet Parasitol., 51: 1-11.

**Payne, R.C., Sukanto, I.P., Partoutomo, S., Jones, T.W., 1994a.** Efficacy of Cymerlarsan treatment of Suramin resistant *Trypanosoma evansi* in cattle. Trop. Anim. Health Prod., 26: 92-94.

**Payne, R.C., Sukanto, I.P., Partoutomo, S., Jones, T.W., Luckins, A.G., Boid R 1994b.** Efficacy of Cymelarsan in Friesian Holstein calves infected with *Trypanosoma evansi*. Trop. Anim. Health Prod., 26: 219–226.

**Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Pérez-Morga, D., 2006.** The trypanolytic factor of human serum. Nat. Rev. Microbiol., 4: 477-486. doi:10.1038/nrmicro1428

**Pinto, C.M., Ocaña-Mayorga, S., Lascano, M.S., Grijalva, M.J., 2006.** Infection by trypanosomes in marsupials and rodents associated with human dwellings in Ecuador. J. Parasitol., 92: 1251–1255.

**Pont A.C. M., Báez M., 2002.** Muscidae. En: Carles-Tolrá Hjorth-Andersen, M.editor. Catálogo de los Díptera de España, Portugal y Andorra (Insecta). Zaragoza: Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA). 2002. pp. 210-213.

**Portillo Rubio, M., 1984.** Claves para la identificación de los tábanos de España: (díptera, Tabanidae). Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca.

**Portillo, M., Báez, M., 2002.** Tabanidae. En: Carles-Tolrá Hjorth-Andersen, M.editor. Catálogo de los Díptera de España, Portugal y Andorra (Insecta). Zaragoza: Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA). 2002. pp. 115-116.

**Powar, R.M., Shegokar, V.R., Joshi, P.P., Dani, V.S., Tankhiwale, N.S., Truc, P. et al., 2006.** A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. Indian J. Med. Microbiol., 24: 72-74.

**Pruvot, M., Kamyngkird, K., Desquesnes, M., Sarataphan, N., Jittapalapong, S., 2010.** A comparison of six primer sets for detection of *Trypanosoma evansi* by polymerase chain reaction in rodents and Thai livestock. Vet. Parasitol., 171: 185-193.

**Quiroz, H., 1986.** Capítulo 5: Enfermedades causadas por flagelados. En: Quiroz, H. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Limusa, S.A. México, pp. 69-118.

**Rademaker, V., Herrera, H.M., Raffel, T.R., D'Andrea, P.S., Freitas, T.P.T., Abreu, U.G.P. et al., 2009.** What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. Acta Trop., 111: 102–107.

**Rae, P.F., Luckins, A.G., 1984.** Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. Ann. Trop. Med. Parasitol., 78: 587-596.

**Raina, A.K., Kumar, R., Sridhar, V.S.R., Singh, R.P., 1985.** Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. *Vet. Parasitol.*, 18: 67-69.

**Ramírez-Iglesias, J.R., Eleizalde M.C., Gómez-Piñeres E., Mendoza M., 2011.** *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Exp. Parasitol.*, 128: 91-96. doi:10.1016/j.exppara.2011.02.010.

**Ranjithkumar, M., Kamili, N.M., Saxena, A., Dan A., Dey, S., Raut, S.S., 2011.** Disturbance of oxidant/antioxidant equilibrium in horses naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.*, 180: 349-353.

**Ray, S., Gupta, C.K. D., Banerjee, K.N., 1972.** Studies on the experimental transmission of *Trypanosoma evansi* in cat by feeding liver, spleen and heart of an infected guineapig. *Indian J. Anim. Health*, 11: 229.

**Rasooly, R., Balaban, N., 2004.** Trypanosome microtubule-associated protein p15 as a vaccine for the prevention of African sleeping sickness. *Vaccine*, 22: 1007-1015.

**Reid, S.A., Copeman, D.B., 2000.** Surveys in Papues New Guinea to detect the presence of *Trypanosoma evansi* infection. *Aust. Vet. J.*, 78: 843-845.

**Reid, S., Husein, A., Hutchinson, G., Copeman, D., 1999.** A possible role for rusa deer (*Cervus timorensis russa*) and wild pigs in spread of *Trypanosoma evansi* from Indonesia to Papua New Guinea. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94:195-197.

**Reid, S.A., Husein, A., Copeman, D.B., 2001.** Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. *Vet. Parasitol.*, 102: 291-297.

**Reid, S.A., 2002.** *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia. *Trends Parasitol.*, 18: 219-224.

**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.

**Reglero, M., Vicente, J., Rouco, C., Villafuerte, R., Gortazar, C., 2007.** *Trypanosoma spp.* infection in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) during a restocking program in Southern Spain. *Vet. Parasitol.*, 149: 178-184.

**Rodrigues, A., Fighera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., Soares, M.P., Milano, J. et al., 2005.** Surtos de tripanossomíase por *Trypanosoma evansi* em equinos no Rio Grande do Sul: Aspectos epidemiológicos, clínicos, hematológicos e patológicos. *Pesq. Vet. Bras.*, 25: 239-249.

**Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., Barros, C.S.L., 2009.** Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. *Vet. Pathol.*, 46:251-258.

**Rodríguez, N.F., Tejedor-Junco, M.T., Hernández-Trujillo, Y., González, M., Gutiérrez, C., 2010.** The role of wild rodents in the transmission of *Trypanosoma evansi* infection in an endemic area of the Canary Islands (Spain). *Vet. Parasitol.* 174: 323-327.

**Rodtian, P., Hin-on, W., Uthaiwan, W., Vitoorakool, P., Trisanarom A., Chaiyasert, S. et al., 2004.** A case report: *Trypanosoma evansi* Infection in Timber Elephant at Lampang Province. 4th Ann Livestock Conf, Department of Livestock Development, Thailand. 26-30 May, 2004. Abstract. 90-100.

**Roy, N., Nageshan, R.K., Pallavi, R., Chakravarthy, H., Chandran, S., Kumar, R. et al. 2010.** Proteomics of *Trypanosoma evansi* Infection in Rodents. *PLoS ONE* 5(3): e9796. doi:10.1371/journal.pone.0009796

**Saleh, M.A., Al-Salahy, M.B., Sanousi, S.A., 2009.** Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedarius*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.*, 162: 192-199.

**Sanderson, L., Khan, A., Thomas, S., 2007.** Distribution of suramin, an antitrypanosomal drug, across the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid interfaces in wild-type and P-glycoprotein transporter-deficient mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51: 3136-3146.

**Sarataphan, N., Vongpakorn, M., Nuansrichay, B., Autarkool, N., Keowkarnkah, T., Rodtian, P. et al., 2007.** Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. *J. Med. Microbiol.*, 56: 1118-1121.

**Sarmah, P.C., 1998.** Transplacental transmisión of *Trypanosoma evansi* in mice. *Indian J. Anim. Sci.*, 68: 344-345.

**Schnauffer, A., Domingo, G.J., Stuart, K., 2002.** Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. *Int J Parasitol.*, 32: 1071-1084.

**Schofield, S., Torr, S.J., 2002.** A comparison of the feeding behaviour of tsetse and stable flies. *Med. Vet. Entomol.*, 16: 177-185.

**Schulz, U., Tupac-Yupanqui, I., Martínez, A., Méndez, S., Delgado, J. V., Gómez, M. et al., 2010.** The Canarian Camel: A Traditional Dromedary Population. *Diversity*, 2: 561-571; doi: 10.3390/d2040561

**Seidl, A., Moraes, A.S., Aguilar, R., Silva, M.S., 1998.** A financial analysis of treatment strategies for *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Prev. Vet. Med.*, 33: 219-234.

**Seidl, A.F., Moraes, A.S., Silva, R.A., 2001.** *Trypanosoma evansi* control and horse mortality in the Brazilian Pantanal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 599-602.

**Sengupta, P.P., Balumahendiran, M., Suryanaryana, V.V., Raghavendra, A.G., Shome, B.R., Gajendragad, M.R., et al., 2010.** PCR-based diagnosis of surra-targeting VSG gene: experimental studies in small laboratory rodents and buffalo. *Vet. Parasitol.*, 171: 22–31.

**Sharma, D.K., Chauhan, P.P.S., Agrawal, R.D., 2000.** Interaction between *Trypanosoma evansi* and *Haemonchus contortus* infection in goats. *Vet. Parasitol.*, 92: 261-267.

**Shegokar, V.R., Powar, R.M., Joshi, P.P., Bhargava, A., Dani, V.S., Katti, R. et al., 2006.** Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in a village in India: preliminary serologic survey of the local population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 75: 869-870.

**Shehu, S.A., Ibrahim, N.D.G., Esievo, K.A.N., Mohammed, G., 2006.** Neuraminidase (Sialidase) activity and its role in development of anaemia in *Trypanosoma evansi* infection. *J. Applied Sci.*, 6: 2779-2783.

**Schlein, Y., Lewis, C.T., 1976.** Lesions in haematophagous flies after feeding on rabbits immunized with fly tissues. *Physiol. Entomol.*, 1: 55-59.

**Silva, R.A.M.S., Herrera, H.M., Domingos, L.B. da S., Ximenes, F.A., Davila, A.M.R., 1995.** Pathogenesis of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and horses: haematological and clinical aspects. *Cienc. Rural.*, 25: 233-238.

**Simpson, A.G., Roger, A.J., 2004.** The real 'kingdoms' of eukaryotes, *Curr. Biol.*, 14: R693–R696.

**Singh, B., Kalra, I.S., Gupta, M.P., Nauriyal, D.C., 1993.** *Trypanosoma evansi* infection in dogs: seasonal prevalence and chemotherapy. *Vet. Parasitol.*, 50: 137-141.

**Skovgård, H., Nachman, G., 2004.** Biological control of house flies *Musca domestica* and stable flies *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) by means of inundative releases of *Spalangia cameroni* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Bull. Entomol. Res.*, 94: 555–567.

**Smith, M.C., Sherman, D.M., 2009.** *Goat Medicine*, second ed. Wiley- Blackwell, Ames.

**Songa, E.B., Painsavoine, P., Wittouck, E., Viseshakul, N., Muldermans, S., Steinert, M. et al., 1990.** Evidence for kinetoplast and nuclear DNA homogeneity in *Trypanosoma evansi* isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 43: 167-180.

**Soulsby, E.J.L., 1987.** Protozoos. En: Soulsby, E.J.L.: *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Interamericana, México, pp. 521-551.

**Stephen, L.E. (Ed.), 1986.** *Trypanosomiasis. A veterinary perspective*. Pergamon press, Oxford, 551 pp.

**Stevens J.R., Brisse S., 2004.** Systematics of Trypanosomes of Medical and Veterinary Importance. In: Maudlin.I. Holmes P.H. and Miles.M.A., editores. *The Trypanosomiasis*. Wallingford: CABI publishing. 2004. p.1-25.

**Stuart K.D., Schnauffer A., Ernst N.L., Panigrahi A.K., 2005.** Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem. Sci.*, 30: 97-105.

**Sumano López, H.S., Ocampo Camberos, L., 2006.** *Farmacología Veterinaria 3ª edición*. Mexico D.F.: McGraw-Hill Interamericana. 2006. pp. 451-526.

**Sumba, A.L., Mihok, S., Oyieke, F.A, 1998.** Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. *Med. Vet. Entomol.*, 12: 417-422.

**Tamarit, A., Gutierrez, C., Arroyo, R., Jimenez, V., Zagalá, G., Bosch, I. et al., 2010.** *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. *Vet. Parasitol.*, 167:74-76.

**Tarazona Vilas, J. M., 2007.** La contribución del Cuerpo Nacional Veterinario a la lucha y erradicación de la durina en España. Centenario Cuerpo Nacional Veterinario 1907-2007. <http://www.acnv.es/centenario/libro/sanidad/tarazona.pdf>

**Tarello, W., 2005.** *Trypanosoma evansi* infection in three cats. *Revue Méd. Vét.*, 156: 133-134.

**Taylor K., Authié E.M.-L., 2004.** Pathogenesis of Animal Trypanosomiasis. En: Maudlin.I. Holmes P.H. and Miles.M.A., editores. The Trypanosomiasis. Wallingford: CABI publishing. 2004. pp.331-368.

**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.

**Thekiso, O.M.M., Inoue, N., Kuboki, N., Tuntasuvan, D., Bunnoy, W., Borisutsuwan, S. et al., 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.

**Thompson, R.D., Mitchell, G.C., Burns, R.J., 1972.** Vampire bat control by systemic treatment of livestock with an anticoagulant. Science, 177: 806-808.

**Thursfield, M., 2007.** Veterinary Epidemiology, 3<sup>rd</sup> ed, Blackwell Science, Oxford, pp. 228-246; 384-403.

**Tobey, E.N., 1906.** Trypanosomata and tripanosomiasis (A summary.). J Med Res., 15: 117–145.

**Tonin, A.A., Da Silva A.S., Costa M.M., Otto M.A., Thomé G.R., Tavares K.S. et al., 2011.** Diminazene aceturate associated with sodium selenite and vitamin E in the treatment of *Trypanosoma evansi* infection in rats. Exp. Parasitol., 128: 243-249.

**Tornquist, S.J., 2010.** Hematology of Camelids. En: Weiss, D. J. y Wardrop, K., editores. Schalm's Veterinary Hematology. 6<sup>th</sup> ed. Iowa. Willey-Blackwell. 2010. pp. 910-917.

**Tran, T., Claes, F., Verloo, D., De Greve, H., Büscher, P., 2009.** Towards a new reference test for surra in camels. Clin. Vaccine Immunol., 16: 999-1002.

**Tuntasuvan, D., Jarabrum, W., Viseshakul, N., Mohkaew, K., Borisutsuwan, S., Theeraphan, A. et al., 2003.** Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. Vet. Parasitol., 110: 227-233.

**Uche, U.E., Jones, T. W., Boid, R., 1992.** Antibody patterns in rabbits showing different levels of susceptibility to an experimental *Trypanosoma evansi* infection. Acta Trop., 52: 139-147.

**Uche, U.E., Jones, T.W., 1993a.** Effect of complement (C3) depletion on the generation of memory in rabbits primed with antigens of *Trypanosoma evansi*. Vet. Parasitol., 47: 205-213.

**Uche, U.E., Jones, T.W., 1993b.** Pathways of complement (C3) activation in rabbits infected with *Trypanosoma evansi*. APMIS, 101: 413-416.

**Uilenberg, G., (adapted by Boyt, W.P.) 1998.** A Field Guide for the Diagnosis, Treatment and Prevention of African Animal Trypanosomiasis. Roma, Italia, FAO. pp. 135-140.

**Upadhye, S.V., Dhoot, V.M., 2000.** Trypanosomiasis in a tiger (*Panthera tigris*). Zoo's Print Journal, 15: 326.

**Vale, G.A., 1980.** Field studies of the responses of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) and other Diptera to carbon dioxide, acetone and other chemicals. Bull. Entomol. Res., 70: 563-570.

**van Hennekeler, K., Jones, R.E., Skerratt, L.F., Fitzpatrick, L.A., Reid, S.A., Bellis, G.A., 2008.** A comparison of trapping methods for Tabanidae (Diptera) in North Queensland, Australia. Med. Vet. Entomol., 22: 26-31.

**van Meirvenne, N., Magnus, E., Büscher P., 1995.** Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. Acta Trop., 60: 189-199.

**Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, P., Pays, A., Joshi, P.P., Katti, R. et al., 2006.** Brief report: Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. N. Engl. J. Med., 355: 2752-2756.

**Varshney, J.P., Varshney, V.P., Dwivedi, S.K., 1999.** Endocrine dysfunctions in clinical trypanosomosis in horses. J. Vet. Parasitol., 13: 33-35.

**Vellayan, S., Mohamad, A., Radcliffe, R.W., Lowenstine, L.J., Epstein, J., Reid, S.A. et al., 2004.** Trypanosomiasis (surra) in the captive Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis sumatrensis*) in Peninsular Malaysia. Proceedings of the International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine, 11: 187-189.

**Ventura, R.M., Takata, C.S.A., Silva, R.A.M.S., Nunes, V.L., Takeda, G.F. Teixeira, M.M.G., 2000.** Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: The total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. J. Parasitol., 86: 1289-1298.

**Ventura, R.M., Takeda, G.F., Silva, R., Nunes, V.L.B., Buck, G.A., Teixeira, M.M.G., 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., Lejon, V., 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.

**Verloo, D., Holland, W., My, L.N., Thanh, N.G., Tam, P.T., Goddeeris, B. et al., 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., Büscher, P., 2001.** General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Vet. Parasitol.*, 97: 183–189.

**Vickerman, K., 1976.** The diversity of the kinetoplastid flagellates in: *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden W.H.R. & Evans D.A. (Eds), Academic Press, London/New York/San Francisco, 1976. pp 1-34.

**Villa, A., Gutierrez, C., Gracia, E., Moreno, B., Chacon, G., Varela Sanz, P., et al., 2008.** Presence of *Trypanosoma theileri* in Spanish cattle. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008. 1149: 352-354.

**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.

**Wall, R., Shearer, D., 2001.** *Veterinary Ectoparasites: Biology, Pathology and Control* 2<sup>nd</sup> ed. Oxford. Blackwell Science. 92-97.

**Wall, R., Shearer, D., 2010.** *Ectoparasitología veterinaria: Biología; patología y Control*. 2010. Zaragoza: Editorial Acribia. pp. 75-102.

**Ward, W.H., Hill, M.W., Mazlin, I.D, Foster, C. K., 1984.** Anaemia associated with a high parasitaemia of *Trypanosoma theileri* in a dairy cow. *Aust. Vet. J.*, 61: 324.

**Warnes, M.L., Finlayson, L.H., 1987.** Effect of host behavior on host preference in *Stomoxys calcitrans*. *Med. Vet. Entomol.*, 1: 53–57.

**Webster, K.A., Rankin, M., Goddard, N., Tarry, D.W. Coles, G.C., 1992.** Immunological and feeding studies on antigens derived from the biting fly, *Stomoxys calcitrans*. *Vet. Parasitol.*, 44: 143-150.

**Wernery, U., Zachariah, R., Mumford, J.A., Luckins, T., 2001.** Preliminary evaluation of diagnostic tests using horses experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. J.*, 161: 287-300.

**Wernery, U., Kaaden, O-R., 2002.** Infectious Diseases of Camelids. Blackwell Science, Berlin, pp. 273-282.

**Witola, W.H., Inoue, N., Ohashi, K., Onuma, M., 2004.** RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate. Exp. Parasitol., 107: 47-57.

**Witola, W.H., Tsuda, A., Inoue, N., Ohashi, K., Onuma, M., 2005.** Acquired resistance to berenil in a cloned isolate of *Trypanosoma evansi* is associated with upregulation of a novel gene, TeDR40. Parasitology, 131: 635-646.

**Woo, P.T.K., 1969.** The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. Can. J. Zool., 47: 921-923.

**Woo, P.T.K., 1970.** The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. Acta Trop., 27: 384-386.

**Wuyts, N., Chokesajjawatee, N., Panyim, S., 1994.** A simplified and highly sensitive detection of *T. evansi* by DNA amplification. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health, 25: 266-271.

**Youssif, F.M., Hassan, T., Mohammed, O.S.A., 2008.** Residues of Cymelarsan<sup>®</sup> in camels (*Camelus dromedarius*) and Nubian goats infected with *T. evansi* in Sudan. Afr. J. Food Sci., 2: 92-97.

**Zhang, Z.Q., Giroud, C., Baltz, T., 1993.** *Trypanosoma evansi*: In Vivo and in Vitro Determination of Trypanocide Resistance Profiles. Exp. Parasitol., 77: 387-394.

## AGRADECIMIENTOS

Todo llega “al golpito”, y aunque esta etapa no ha terminado aún, el hecho de estar escribiendo los agradecimientos de la tesis, anuncia que pronto tendrá lugar la defensa de la misma frente al tribunal. Esto marcará el comienzo de una nueva etapa en mi vida... ¿Quién lo iba a decir? Parecía que nunca iba a llegar... Con una mezcla de sentimientos un tanto contradictorios, en los que aparece nostalgia por haber dejado atrás tantos momentos, también aparece la alegría por llevar guardados con cariño esos tantos recuerdos, que se agarran de la mano a la ilusión y curiosidad por lo bueno que pueda deparar el futuro. Aunque unas veces fue agradable al tránsito y otras se tornaba un tanto pedregoso, no habría sido posible el haber recorrido este camino durante estos últimos cuatro años, sin la cantidad de personas que me han mostrado su apoyo en el plano profesional o personal, así como en ambos. Se suele decir que es de bien nacido ser agradecido, y por tanto no quisiera ser menos, pretendiendo con las siguientes líneas mostrar mi gratitud a todos ellos.

Sin lugar a dudas, las primeras líneas van a ir dirigidas a mis directores. En primer lugar a Carlos Gutiérrez, quien me ha visto crecer desde que era estudiante de último año hasta estos momentos, mostrándome una calidad profesional y sobre todo humana que me ha permitido seguir por la senda adecuada durante estos años... horas en el laboratorio, en el campo, tertulias agradables de camino a las granjas y siempre valorados consejos, permitiéndome desde el primer momento integrarme como uno más del grupo. A mis codirectoras Margarita González y Mayte Tejedor, que siempre han estado al pie del cañón durante las largas jornadas compartidas en el laboratorio del CULP, cantidad de revisiones de todo el material escrito, consejos, etc., junto a la amistad forjada desde el comienzo. ¡Gracias equipo! porque ustedes han sido el cimiento de este proyecto cuyo esfuerzo ha sido compartido.

A las instituciones y administraciones correspondientes, especialmente a la ULPGC, desde donde se obtuvieron los fondos y la beca para iniciar esta andadura.

A mi hermana y a mis padres, por inculcarme la constancia, el espíritu de lucha, permitirme tomar decisiones con libertad y tener la certeza de que puedo contar siempre con ustedes. A ustedes que siempre me han apoyado, a pesar de no entender muy bien que casi un tercio de mi existencia la haya invertido en esta Facultad, y haber además padecido sobre todo los peores momentos, más que los éxitos, derivados de esta inversión. Por todo esto les estoy

profundamente agradecido. Espero a partir de ahora poder compensarles el tiempo que les he robado... También a mis tíos y a mis primos, que siempre se han interesado por mi trayectoria tanto personal como profesional.

A Joha, por haber sido una persona muy importante que me acompañó durante los comienzos de mi andadura en este proyecto, por el recuerdo que tengo del entusiasmo que le caracteriza, y por hacerme ver que habían cosas más importantes a valorar que el propio trabajo...aunque te encuentres casi en las antípodas, desde aquí mi agradecimiento.

A los ganaderos de la isla de Gran Canaria, y de forma especial a Paco Jiménez y sus trabajadores...sin sus animales, permiso de accesos a las explotaciones y colaboración no habría podido plantearse este proyecto. A los compañeros veterinarios Guaci Jiménez, Elsa Díaz, Alejandro “el de Valleseco”, el Inglés, Antonio “el de Teror”, Guillermo “el de la Aldea”, Samuel “el de Ingenio”, Sergio y Yeray “Los *Haemonchus*”, Jorge González, Paco Doreste, Alexis Ruiz, Luigi, Pitti...sin ustedes el acceso a muchas explotaciones muestreadas habría sido imposible. A Alberto y Cande, por permitirme el uso del Laboratorio de Patología, y a Juan Alberto por haberme ayudado en algunas cuestiones relativas a los rumiantes y los camellos.

Al Dr. Angelo Santana del Pino del Departamento de Matemáticas de la ULPGC, por su amable asesoramiento en la planificación estadística del estudio en rumiantes. Al Dr. Javier Lucientes de la Universidad de Zaragoza, que aunque él a lo mejor no lo recuerde, me dio las primeras recomendaciones en el diseño de la trampa de insectos a través de mail. Al Dr. Marco Báez Fumero de la Universidad de La Laguna, quien me enseñó algunos aspectos de la entomología canaria y me ayudó a la identificación de vectores a través de teléfono, mail y envío de insectos recolectados a la isla vecina.

A Juan Manuel Santana, por ser un referente antes de empezar mi carrera, y a su equipo de la C.V. Arucas por dedicarme tiempo de formación durante las “estancias de verano” en mi etapa de estudiante. A los antiguos compañeros buiatras, Marcos Suárez y Juan Manuel Arencibia, que me permitieron dar los primeros pasos como veterinario de campo. A mis antiguos compañeros veterinarios del HCV de la Facultad de Veterinaria (Oliver, Juanmi, Armiche Fernández, Elena Lezcano, Jana Arteaga, Miguel “el chicharrero”, Sonia Peinado, Carlos Melián) y su personal (los inseparables Antonio y Paco, Tere, Déborah, Mayeya, Nadia). La

experiencia personal y profesional acumulada durante este tiempo con todos ustedes ha sido, sin duda, muy valiosa.

A los compañeros doctorandos que fueron llegando a goteo al despacho: Elena Carretón, Luca Gradilone y Jorgelina Méndez. Aparte de la amistad surgida, gracias a la compañía de ustedes se ha hecho, sobre todo, más llevadera la escritura de esta tesis... ¡se va el veterano de guerra, así que mi mesa sale a sorteo! Sepan que les voy a echar mucho de menos.

A Irene Cabello, mi técnico de laboratorio que siempre está al pie del cañón ¡Muchas gracias Irenita!...aparte de la buena amistad surgida, tu asistencia con un “sí” y una sonrisa por respuesta en las labores de laboratorio y de campo, ha hecho menos pesado este esfuerzo. A Sara López, que me ayudó en muestreos mientras disfrutaba de su beca para alumnos de últimos curso. A Diana Rodríguez, que ya habiendo cumplido sus horas de estancias, arriesgaba sus exámenes por ayudarnos en los chequeos de los camellos ¡tienes mucho mérito! A la compañera de Tolousse, Claudia Ribeiro que, durante su estancia con el equipo, colaboró activamente en todo el trabajo programado. A todos aquellos alumnos de la Facultad de Veterinaria, con los que tuve el placer de poder compartir mis humildes conocimientos.

A todas las personas que conocí y me ayudaron en Ciudad Real durante mi estancia en el IREC, agradeciendo de forma especial al Dr. de la Fuente y a la Dra. Ruth Galindo, por permitirme mucho de su tiempo y de sus conocimientos, a pesar del volumen de trabajo que tenían, y a Rosa Fernández y su familia por la hospitalidad recibida en su casa. Sin duda, guardo un grato recuerdo de esta etapa en las tierras manchegas, que ha supuesto para mí una experiencia vital. Agradecer al Dr. Álvaro Hernández, que aparte de brindarme su amistad, me orientó en las ayudas para la movilidad.

A mis amigos, sobre todo a los aruquenses que son los que más cerca tengo y ello ha facilitado poder mantener un contacto más frecuente (Airam, Aday, Víctor, Miguel, Nico, Laure, Aníbal, Fátima, José Alberto). ¡De forma especial a Héctor y a David, además de amigos, agradecerles su soporte informático, que se convierte en un apoyo moral muy importante cuando los “cacharros” no quieren funcionar! Y de nuevo a David, por la ayuda en la maquetación, impresión, encuadernación.... Gracias a ustedes por respetar y entender el tiempo que he sacrificado durante este periodo, y darle sentido a la profundidad que entraña la palabra amistad.

A Bea Domínguez, una persona muy especial que he tenido la suerte de conocer durante mi última etapa de la tesis, con la que he compartido muchos momentos y siempre ha tenido una sonrisa y una alegría contagiosa, sabiendo transmitirme la energía adecuada para que vea las cosas con más claridad ¡Beaaa, muchas gracias de corazón!

A los tantos compañeros de promoción con los que forjé y hoy en día sigo manteniendo una estrecha amistad...”nombrar a tantos antiguos compañeros/ hoy aquí sería oportuno/ para no olvidarme de nadie/ mejor no nombro a ninguno”...sepan perdonarme, que son muchos a nombrar y no me quiero dejar a nadie atrás.

A los compañeros y profesores que he tenido en la escuela de idiomas de Arucas...gracias a los conocimientos de inglés adquiridos junto a ustedes, se ha hecho más fácil la consulta de material bibliográfico y la escritura de los trabajos.

¿Cómo olvidar a los amigos de la música? En primer lugar a los amigos del grupo Granjeros con los que compartí muchos ensayos, escenarios y parrandas... aunque ya no les acompañe siempre guardo “esa musiquita”. En segundo lugar a los amigos que han surgido en torno a la Universidad del Bochinche, por esos momentos agradables de escape musical y de tertulia, que aunque pocos, he tenido la grata oportunidad de compartir algunos, en estos dos últimos años... ¡Espero en las próximas estar menos “liado”!

De forma especial a los amigos y compañeros Ike, Luis, Fernando y Gonzalo, del “Quinteto de Cuatro” o “Cuarteto de Cinco”... aparte de compartir gustos musicales, nos une una relación profesional, y una relación de amistad que ha ido creciendo desde que comenzamos a juntarnos de forma “semanal” en enero de 2008. Sin lugar a dudas, tengo que agradecerles la oportunidad de disfrutar los “ensayos músico-gastronómicos” de forma compartida, los cuales me han supuesto a nivel personal una solución de continuidad total a la rutina semanal, quedando además patente que la profesión no está reñida con el disfrute de las pasiones ¡Nunca las mañan pierdan! También desde aquí agradecer a todos los amigos surgidos a raíz de esta relación: Andrés, Ricardo, los amigos salteños...

Teniendo en cuenta el atrevimiento que supone querer recordar todos los detalles de estos últimos cuatro años, por último, quiero dar las gracias y pedir disculpas a todo aquel que, aún habiendo contribuido en mi camino durante esta etapa, pueda no haber citado anteriormente.

Dice la sabiduría popular, que para dejar huella de haber existido hay que escribir un libro, plantar un árbol y tener descendencia...de momento creo haber cumplido con las expectativas del primero de los citados, por lo menos a nivel personal. Espero también a partir de ahora, disfrutar de la profesión si se me permite, y cultivar otros aspectos que también me permitan dejar una grata huella, y sobre todo dedicarles el tiempo y la atención robada hasta el momento a las personas que quiero.

Gracias a todos y salud.





