

TRIPANOSOMOSIS ANIMALES (transmitidas por la mosca tse-tsé, excepto la surra y la durina)

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La tripanosomosis animal de origen africano es una enfermedad compleja causada por varias especies de protozoos parásitos del género *Trypanosoma*, y transmitida de forma cíclica principalmente por el género *Glossina* (mosca tse-tsé) en el África subsahariana (latitudes 10° Norte a 20–30° Sur) y en ciertas zonas de la Península Arábiga, pero también de forma mecánica por varias moscas picadoras (tábanos, dípteros del género *Stomoxys*, etc.) en África y en algunas otras partes del mundo. Esta enfermedad puede afectar a varias especies de mamíferos pero, desde el punto de vista económico, la tripanosomosis transmitida por la mosca tse-tsé es especialmente importante en el ganado vacuno, en el cual la enfermedad se denomina nagana. Está producida sobre todo por *Trypanosoma congolense* (subgénero *Nannomonas*), *T. vivax* (subgénero *Duttonella*) y, en menor medida, *T. brucei brucei* (subgénero *Trypanozoon*). Sin embargo, otros hospedadores, tales como caballos, burros, camellos, cabras, ovejas, cerdos y perros pueden verse afectados, y se deben considerar otras especies de *Trypanosoma*, como *T. simiae* (que se encuentra principalmente en cerdos) y las dos subespecies zoonóticas *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* que sobre todo se hallan en humanos, ganado bovino y cerdos. Otras especies de *Trypanozoon* derivadas del linaje de *T. brucei* que no son transmisibles por las moscas tse-tsé, como *T. evansi* (responsable de la “surra”, transmitida mecánicamente por insectos picadores) y *T. equiperdum* (responsable de la “durina”, transmitida por vía venérea entre équidos) se describen en los capítulos 3.1.21 y 3.5.3, respectivamente. Debido a que algunos de estos parásitos no son necesariamente transmitidos por la mosca tse-tsé y se han diseminado fuera de África, con la excepción de las dos últimas especies, este capítulo está dedicado a la tripanosomosis animal de origen africano.

La tripanosomosis animal de origen africano es clásicamente una enfermedad aguda o crónica que causa fiebre intermitente acompañada de anemia, edema, lagrimeo, inflamación de los ganglios linfáticos, aborto, descenso de la fertilidad y pérdida de apetito y peso que conduce a una muerte prematura en los casos agudos y a la presentación de síntomas digestivos o nerviosos con caquexia y finalmente la muerte en las formas crónicas. En zonas enzoóticas es frecuente hallar portadores subclínicos o sanos de los parásitos, pero existen variaciones estacionales en cuanto a la transmisión y a la aparición de casos clínicos.

Identificación de los agentes: Se pueden utilizar varias técnicas de detección de parásitos, incluyendo el examen microscópico de gota gruesa o fina de sangre, húmeda o seca-teñida. La sensibilidad diagnóstica aumenta de forma significativa concentrando los parásitos antes de examinarlos, complementándolo con el uso de un microscopio de contraste de fases o de campo oscuro. Las técnicas de concentración de parásitos mediante centrifugación tienen la ventaja añadida de que el hematocrito y, por tanto, el nivel de anemia, se puede determinar en animales determinados y/o en el rebaño. Una prueba muy específica y más sensible, utilizada cada vez por más laboratorios, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite identificar a nivel de género, especie, subespecie o tipo de los parásitos, dependiendo de los casos. Los cebadores altamente específicos o la secuenciación de productos de la PCR permiten identificar *T. brucei* spp. zoonóticos, lo que aporta nueva información sobre el papel de la fauna doméstica y salvaje en el mantenimiento de algunos focos de la enfermedad del sueño. Además, en algunas áreas geográficas donde puede aparecer nagana, surra y durina, es necesario identificar *Trypanozoon* no

transmitido por la mosca tse-tsé a nivel de especie, ya que las medidas de control pueden ser diferentes de las de nagana.

Pruebas serológicas: La prueba de inmunofluorescencia indirecta y la detección de anticuerpos por enzimoimmunoanálisis (ELISA) son pruebas utilizadas de forma habitual para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma* en el ganado bovino. En concreto, el ELISA para la detección de anticuerpos se presta a la automatización y debería permitir un alto grado de estandarización cuando se hayan desarrollado y validado los antígenos recombinantes o, mejor, formas sanguíneas de los parásitos producidas in-vitro, cuya labor está actualmente avanzando. No obstante, hoy en día se llevan a cabo ELISA para detección de anticuerpos contra *T. congolense*, *T. vivax* y *T. brucei brucei* con antígenos de tripanosoma solubles nativos generados en roedores, y presentan una sensibilidad y especificidad razonables.

Requisitos para las vacunas: En la actualidad no se utilizan vacunas.

A. INTRODUCCIÓN

Los tripanosomas son protozoos flagelados del plasma sanguíneo, la linfa y varios tejidos de sus hospedadores. El género *Trypanosoma* pertenece a la rama de los protozoos del orden *Kinetoplastida*, familia Trypanosomatidae. Los tripanosomas transmitidos por la mosca tse-tsé pertenecen al grupo de los salivares, subgénero *Nannomonas* en el caso de *T. congolense* y *T. simiae*, *Duttonella* en el caso de *T. vivax*, y *T. uniforme* y *Trypanozoon* en el caso de *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. evansi* y *T. equiperdum*.

La tripanosomosis animal de origen africano es una enfermedad compleja causada por una o varias de las especies de *Trypanosoma* spp., y se transmite sobre todo cíclicamente por el género *Glossina* (moscas tse-tsé), pero también por otras moscas picadoras, como tábanos y *Stomoxys* (Baldacchino *et al.*, 2014). La mosca tse-tsé se extiende geográficamente por 10 millones de kilómetros cuadrados y afecta a 37 países de África subsahariana (entre la latitud 10° Norte y la 20–30° Sur) y algunas zonas de la Península Arábiga. La enfermedad, que se denomina "nagana", afecta a varias especies de mamíferos salvajes y domésticos, pero, desde el punto de vista económico, la tripanosomosis africana es particularmente importante en el ganado vacuno (en África del Sur se refieren a ella como la enfermedad de la mosca tse-tsé). Está causada fundamentalmente por *Trypanosoma congolense*, sobre todo el tipo Savannah, que es el más patógeno (Bengaly *et al* 2002), *T. vivax*, el más prevalente, y, en menor grado, *T. brucei brucei*.

Otros hospedadores como caballos, burros, camellos, cabras, ovejas, cerdos, perros e incluso humanos pueden verse afectados, y otras especies de *Trypanosoma* también debe tenerse en cuenta, así como otros medios de transmisión. *Trypanosoma congolense* tipo forest y costa de Kenia son patógenos leves para el ganado bovino, su epidemiología no está completamente dilucidada. *Trypanosoma uniforme* y *T. simiae*, un parásito de los cerdos, son otras especies de *Trypanosoma* menos comunes transmitidas por la mosca tse-tsé. *Trypanosoma vivax* también se transmite mecánicamente por las moscas picadoras, entre las que los tábanos y las moscas del género *Stomoxys* suelen ser las más importantes, como lo pone de manifiesto su presencia en América del Sur y Central y también por lo observado en zonas de África que están libres de la mosca tse-tsé (Etiopía, Chad, Senegal, Sudán, etc.). La tripanosomosis transmitida por la mosca tse-tsé puede afectar a los caballos y a los camellos y es una barrera natural que impide la introducción de camélidos en la región del Sahel del oeste de África. Se han observado muy pocos casos en el hombre causados por *Trypanosoma* spp. como *T. congolense* y *T. brucei brucei*, pero también *T. evansi* (incluida *lewisii*, un parásito de la rata cosmopolita; Truc *et al.*, 2013). La tripanosomosis transmitida por la mosca tse-tsé causa la enfermedad del sueño, crónica o aguda en el ser humano, a través de la infección por *T. brucei gambiense* o *T. brucei rhodesiense*, respectivamente. Una amplia gama de animales salvajes y domésticos, incluidos el ganado vacuno y los cerdos, pueden actuar como reservorios de estos parásitos humanos, especialmente para estos últimos. En consecuencia, las manipulaciones de laboratorio deben realizarse con los procedimientos adecuados de bioseguridad y bioprotección, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (ver Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*) especialmente cuando se manejan muestras de ganado vacuno, porcino o fauna salvaje. Bajo el concepto en expansión de "Una sola salud", la identificación de estos agentes zoonóticos se convierte en una necesidad para el control de la tripanosomosis humana africana (Holmes, 2015). De manera similar, en América Latina, e incluso en los EE.UU., se debe tener especial cuidado al manipular muestras de animales debido a la posible presencia de *T. cruzi* (en bovinos, ovinos, perros, etc.), como se ha demostrado recientemente en un caballo con signos clínicos en Texas (Bryan *et al.*, 2016).

Otras dos especies de *Trypanozoon* derivadas del linaje de *T. brucei* no son transmitidas por moscas tse-tsé: (i) *T. evansi*, el agente causante de la "surra", especialmente patógeno para camellos y caballos en África, pero también para caballos, bovinos, búfalos y otros en América Latina y Asia; es transmitido mecánicamente por

tabánidos y *Stomoxys*, pero puede encontrarse en los mismos hospedadores y, a veces, en las mismas áreas que los agentes de la nagana; solo el diagnóstico molecular permite distinguir el agente de la surra de otro *Trypanozoon* involucrado en la nagana; y, (ii) *T. equiperdum*, el agente causal de la durina, una enfermedad venérea mundial transmitida a caballos y mulas. Los procedimientos de diagnóstico para estos parásitos se presentan en los capítulos 3.1.21 y 3.5.3, respectivamente.

Los signos clínicos de la tripanosomosis animal de origen africano pueden incluir fiebre intermitente, anemia, edemas, aborto, descenso de la fertilidad y caquexia. Generalmente en los animales afectados aparece anemia, que va seguida de una pérdida de condición corporal, una disminución de la productividad y, a menudo, mortalidad. Los síntomas *post-mortem* pueden incluir la caquexia, el aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, hepatomegalia y esplenomegalia, exceso de líquido en las cavidades del cuerpo y hemorragias petequiales. En los animales muertos durante la fase crónica de la enfermedad, los órganos linfáticos generalmente ya no están inflamados y es habitual encontrar miocarditis graves. Ni los signos clínicos ni los hallados *post-mortem* de la tripanosomosis transmitida por la mosca tse-tsé son patognomónicos. Por tanto, el diagnóstico debe basarse en técnicas directas que confirmen la presencia de los tripanosomas bien por visualización microscópica, o por técnicas serológicas indirectas o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), completada en algunos casos por la secuenciación. Clínicamente, la tripanosomosis africana puede confundirse con la babesiosis, la anaplasmosis, la teileriosis, la hemoncosis o incluso con la erliquiosis, la rabia o intoxicaciones por plantas o infecciones por *T. cruzi* en América Latina. Para ayudar a lograr el diagnóstico definitivo, sirven las observaciones clínicas, la evolución de la enfermedad y el contexto epidemiológico, pero se basa fundamentalmente en el diagnóstico de laboratorio.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Existen una gran variedad de pruebas de diagnóstico (Toure, 1976) y los investigadores tratan aún de mejorar las existentes y de desarrollar otras nuevas. Las pruebas de diagnóstico actuales varían en cuanto a la sensibilidad y la especificidad, la comodidad de aplicación y el coste (Paris *et al.*, 1982). La elección de una prueba concreta se regirá por criterios económicos y por la disponibilidad de personal especializado, pero especialmente por las necesidades del diagnóstico. Por ejemplo, se aplican diferentes grados de sensibilidad y especificidad para la confirmación de la infección en un animal individual en comparación con la detección de la infección a nivel de rebaño. De forma similar, la/s prueba/s de diagnóstico para establecer la prevalencia parasitológica de la tripanosomosis es diferente de la requerida para establecer la presencia o ausencia de la enfermedad en una zona. Se pueden conseguir diagnósticos fiables combinando pruebas de diagnóstico apropiadas. El que la interpretación de los resultados de las pruebas diagnósticas sea fiable dependerá de la validez de las pruebas y de si las muestras se han escogido/obtenido de forma adecuada, de si son del tamaño adecuado y de la forma de realizar las pruebas de diagnóstico (véase la Tabla 1).

Tabla 1. Métodos analíticos de los que se dispone para el diagnóstico de las tripanosomosis animales y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Comprobar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Extensiones de gota fina de sangre	–	+	–	+++	+	n/a
Detección de ADN/PCR	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Extensiones de sangre húmedas	-	–	–	++	–	n/a
Extensiones de gota gruesa de sangre	–	+	–	+	+	n/a

1 Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Comprobar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Técnica de centrifugación del hematocrito (HCT, Woo)	+++	+++	+++	+++	+++	n/a
Técnica de la capa leucocitaria (BCT, Murray)	-	-	++	++	++	n/a
Columnas de intercambio de aniones	-	+	++	-	-	n/a
Inoculación en roedores ²	+	++	++	++	-	n/a
Cultivo <i>in-vitro</i>	-	-	-	-	-	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
IFAT	++	++ ³	++ ³	-	++ ³	n/a
ELISA	+++	+++	+++	-	+++	n/a

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan mucho su aplicación; - = no adecuado para esta finalidad; n/a = no aplicable.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IFAT = prueba de inmunofluorescencia indirecta; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1. Identificación del agente

Las técnicas de detección de parásitos son muy específicas (llegan a nivel de subgénero), pero su sensibilidad es relativamente baja (es decir, la proporción de falsos negativos es alta), lo cual les confiere un bajo valor predictivo negativo (NPV). La sensibilidad es especialmente baja cuando se consideran los resultados en un animal determinado y no a nivel del rebaño. La sensibilidad es muy variable a lo largo de la infección: (i) en la fase inicial, la sensibilidad es elevada porque los parásitos se multiplican activamente en la sangre en ausencia de un control inmunológico; (ii) durante la fase crónica, la sensibilidad es baja porque, debido a la respuesta inmunitaria del hospedador, casi nunca se observan parásitos en la sangre; (iii) finalmente, la sensibilidad es prácticamente nula en los portadores sanos, en los que nunca se observan los parásitos. Esta variación implica que, en una población, las técnicas de detección del parásito resultan muy sensibles durante los brotes epizooticos (cuando la mayoría de los animales está en las primeras fases de la infección), y son de sensibilidad baja o muy baja en zonas enzoóticas estables (donde la mayoría de los animales está en la fase crónica de la infección), especialmente durante las fases subclínicas de la infección, lo cual hace que los animales parezcan portadores sanos. Debido a esta baja sensibilidad, la prevalencia parasitológica aparente de la tripanosomosis es un poco más baja, o mucho más baja, que la prevalencia parasitológica verdadera. La baja sensibilidad diagnóstica hace que sea difícil detectar la tripanosomosis cuando está presente con una baja prevalencia, y es imposible establecer la ausencia de la enfermedad con un grado alto de seguridad. Además, en las zonas donde se usan ampliamente los fármacos tripanosomicidas, no se pueden detectar los parásitos durante el periodo post-tratamiento.

Existen varias técnicas de detección de parásitos, cada una con una sensibilidad variable. La elección dependerá de las instalaciones de laboratorio de las que se disponga y del objetivo del diagnóstico según las recomendaciones indicadas en la Tabla 1.

² Prueba útil solo si se sospecha de infección por *T. evansi*.

³ La CATT (prueba de aglutinación en placa para *T. evansi*) debe utilizarse si se sospecha de infección por *T. evansi*.

1.1. Técnicas de examen directo

Las técnicas más simples son el examen de extensiones de gota fina o gruesa, o bien extensiones húmedas, de sangre fresca obtenidas generalmente en la vena auricular, la vena yugular o la vena coccígea. Entre las técnicas de examen directas, las extensiones de gota fina de sangre teñida se consideran más específicas pero menos sensibles que las otras dos. La especificidad y la sensibilidad real de estas técnicas dependen directamente del volumen de sangre realmente examinado y de la destreza y experiencia del microscopista. El examen de frotis de sangre teñidos con Giemsa (GSBS) sigue siendo la prueba de diagnóstico clásica y de referencia para la infección por tripanosomas.

1.1.1. Extensiones de sangre húmedas

Se realizan colocando una gota de sangre (de unos 2 μ l) sobre una porta limpio de microscopio y se cubre con un cubreobjetos (22 x 22 mm). La sangre se examina al microscopio a un aumento total de $\times 400$ con apertura de condensador, contraste de fase o contraste de interferencia. Se examinan aproximadamente 50–100 campos. Se puede reconocer a los tripanosomas por su movimiento entre los eritrocitos (RBC).

El método es simple, barato y da resultados inmediatos. Dependiendo del tamaño del tripanosoma y de sus movimientos, se puede hacer un diagnóstico preliminar de la especie de tripanosoma. La confirmación final de la especie se hace mediante el examen de la preparación teñida (GSBS).

La sensibilidad diagnóstica del método es generalmente baja, pero depende de la experiencia del analista y del grado de la parasitemia. Se puede mejorar la sensibilidad de forma notable lisando los RBC antes del examen utilizando un agente hemolítico.

1.1.2. Extensiones de gota gruesa de sangre

Se hacen depositando una gota de sangre (5–10 μ l) sobre un porta limpio de microscopio y extendiéndola sobre un área de 2 cm de diámetro, aproximadamente, utilizando el borde de otro porta. El grosor de la extensión resultante debe ser tal que, cuando se seque, se puedan leer a través de ella los números de la esfera de un reloj de pulsera. La gota se seca completamente agitándola rápidamente en el aire y, sin fijación, se deshemoglobinizan por inmersión en agua destilada durante unos pocos segundos y se seca antes de teñirla. Debe guardarse un frotis seco y protegido del polvo, el calor, las moscas y otros insectos. Se tiñe durante 30 minutos con colorante Giemsa diluido al 4% en una solución salina tamponada con fosfato, pH 7.2. El tiempo de tinción y la dilución del colorante pueden variar según el colorante y la técnica. Por consiguiente, es importante comenzar con las instrucciones del fabricante y variar el tiempo de tinción y la concentración de la tinción hasta obtener los resultados óptimos. A continuación, el frotis teñido se lava con agua tamponada y se examina con un aumento total de entre $\times 500$ y $\times 1000$.

El método es simple y relativamente barato, pero los resultados son lentos debido al proceso de tinción; no obstante, existen kits comerciales para tinción rápida. Los tripanosomas se reconocen fácilmente por su morfología general, pero pueden resultar dañados durante el proceso de tinción. Esto puede hacer difícil la identificación a nivel de subgénero.

1.1.3. Extensiones de gota fina de sangre: frotis de sangre teñido con Giemsa

Las extensiones de gota fina de sangre se hacen depositando una gotita de sangre (de unos 3 μ l), por ejemplo, desde un tubo capilar para microhematocrito, sobre un porta de microscopio limpio aproximadamente a 20 mm desde un extremo (dejando espacio para aplicar la gota gruesa) y extendiéndolo con el borde de otro porta. Este porta se coloca en un ángulo de aproximadamente 30° con el primer porta y se retira hasta que haga contacto con la gota de sangre. Se deja que la sangre corra a lo largo del borde del porta extensor, que se empuja hacia el otro extremo del porta con un movimiento bastante rápido pero suave. Así, la sangre es atraída (por capilaridad) por el porta que se utiliza para extender. Si se utiliza la cantidad correcta de sangre, el porta debería cubrirse de una extensión de sangre uniforme antes de alcanzar el extremo del porta y presentar la forma de una bala. Lo ideal es preparar las extensiones de gotas finas de tal forma que los RBC estén juntos pero que no se solapen. El porta se seca rápidamente agitándolo en el aire y se protege del polvo, las moscas y de otros insectos. El porta se fija durante 3 minutos en metanol, y se tiñe como la extensión de gota gruesa. Después de la tinción, se lava el porta suavemente con agua corriente y se deja secar. Una variación de este método es fijar en metanol durante 2 minutos, aplicar colorante May-Grünwald durante 2 minutos, y después añadir un volumen igual de agua tamponada, pH 7,2, incubar 8 minutos y dejar escurrir. Por último, ciertos métodos rápidos emplean una tinción

mediante 4-5 inmersiones de 1 segundo cada una, de forma seriada en metanol, solución eosinofílica y solución basofílica. Se examinan aproximadamente 50–100 campos del frotis de gota fina teñido, con una lente de objetivo de aceite de inmersión de $\times 50$ o $\times 100$ (aumentos totales de $\times 500$ – $\times 1000$), antes de considerar que la muestra es negativa. Incluso después de haber detectado un tripanosoma, se investigan aproximadamente 20 campos más para determinar si está presente más de una especie. Se debe explorar cuidadosamente el extremo más puntiagudo de la extensión porque, debido a sus propiedades de capilaridad, los tripanosomas pueden concentrarse en dicho lugar (esto es particularmente cierto en el caso de especies grandes como *T. brucei* y *T. vivax*).

La técnica descrita anteriormente también puede utilizarse para muestras de biopsia de la linfa obtenidas de ganglios linfáticos o de líquido edematoso, mediante punción. También puede ayudar al diagnóstico diferencial de otros hemoparásitos, como *Anaplasma*, *Babesia* y *Theileria*.

Generalmente, se prepara un frotis fino y uno grueso de la misma muestra. Los frotis gruesos contienen más sangre que los finos y, por tanto, tienen una sensibilidad diagnóstica mayor. Los frotis finos, por otra parte, permiten la identificación del subgénero de *Trypanosoma*. Los subgéneros de tripanosoma se pueden identificar mediante las siguientes características morfológicas:

- i) *Duttonella*: *Trypanosoma vivax*, 20–27 μm de largo, la membrana ondulante es media o no evidente, flagelos libres presentes en el extremo anterior, extremo posterior redondeado, cinetoplasto grande y terminal. *Trypanosoma uniforme* presenta las mismas características pero es más pequeño (12–20 μm de largo);
- ii) *Trypanozoon*: *Trypanosoma brucei* (por ejemplo, *T. brucei brucei*, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*) es una especie de tripanosoma polimórfico. Se pueden distinguir dos formas diferentes, es decir, una forma larga fina y una forma corta gruesa. A menudo, se observan formas intermedias con características tanto de formas finas como gruesas. El citoplasma en muestras teñidas contiene a menudo gránulos basófilos.
 - a) *Trypanosoma brucei* (forma larga fina): 17–30 μm de largo y alrededor de 2,8 μm de ancho, membrana ondulante llamativa, flagelo libre presente en el extremo anterior, extremo posterior en punta, cinetoplasto pequeño y subterminal. *Trypanosoma evansi* y *T. equiperdum* pueden confundirse con la forma larga de *T. brucei* en los équidos.
 - b) *Trypanosoma brucei* (forma corta gruesa): 17–22 μm de largo y alrededor de 3,5 μm de ancho, membrana ondulante llamativa, sin flagelo libre, extremo posterior en punta, cinetoplasto pequeño y subterminal.
- iii) *Nanomonnas*: *Trypanosoma congolense* mide 8–25 μm (especie pequeña), membrana ondulante no evidente, sin flagelo libre, extremo posterior redondeado, cinetoplasto de tamaño mediano y terminal, a menudo situado lateralmente. Aunque se considera que *T. congolense* es monomórfico, a veces se observa un grado de variación morfológica. Entre los *Nanomonnas* se han descrito varios morfotipos hasta ahora, desde los más alargados a los más gruesos: el hiperleptomorfo (forma de rhodani, muy largo y fino, con un flagelo libre), el leptomorfo (es el caso de alargado con un flagelo libre) el isomorfo (forma congolense, corto, sin flagelo libre), el paquimorfo (en forma de montgomery, corto y robusto; $0,25 < \text{cociente peso/longitud} < 0,34$, sin flagelo libre) y el hiperpaquimorfo (forma hiper-montgomery, corto y muy grueso; $0,35 < \text{cociente peso/longitud} < 0,7$, sin flagelo libre) (Desquesnes *et al.*, 2012). Además, también se han descrito el esferomorfo y las rosetas. Dentro de *T. congolense*, hay diferentes tipos o subgrupos (savannah, forest, kilif o costa de Kenia) que tienen diferente patogenicidad (Bengaly *et al.*, 2002); también existen gradas de diferencias de patogenicidad dentro del subgrupo savannah. Estos tipos se pueden distinguir solamente mediante la PCR. Finalmente, el parásito del cerdo y el mono, *T. simiae*, es pleomórfico, con un aspecto entre hiperleptomorfo y paquimorfo, con mayor frecuencia en forma de parásito largo (leptomorfo); tiene una membrana ondulada bien desarrollada y ocasionalmente presenta un flagelo libre; también puede tener el aspecto de un clásico *T. congolense*.
- iv) *Megatrypanum*: no se transmite por la mosca tse-tsé; son parásitos estercorearios, transmitidos cíclicamente por tabánidos; sin embargo, se encuentran con frecuencia en muestras de sangre bovina y deben distinguirse de *Trypanosoma* spp. patógenos. *Trypanosoma theileri* suele medir 60–70 μm (especies grandes), pero determinados ejemplares pueden medir entre los 19 y 120 μm , la membrana ondulante es llamativa, tiene un flagelo largo libre, el extremo posterior en punta y rígido, el cinetoplasto es grande y situado cerca del núcleo y en posición marginal. Normalmente *Trypanosoma*

theileri no es patógeno, pero su presencia puede confundir el diagnóstico parasitológico. En Europa occidental y Japón, *T. theileri* es la única especie de tripanosoma que afecta al ganado vacuno. Como consecuencia de su transmisión cíclica por tabánidos, vectores altamente cosmopolitas y abundantes, este parásito es muy común en todo el mundo y tiene una prevalencia muy alta en los bovinos. Sin embargo, la detección es muy infrecuente debido a que la parasitemia es muy baja. Otras especies relacionadas, como *T. ingens* (que se encuentran en bovinos y antílopes), se pueden distinguir por una banda transversal típica no teñida dentro del núcleo en GSBS.

- v) Otras especies: en el área de distribución de la tripanosomosis animal de origen africano, pueden hallarse otros *Trypanosoma* spp. en muestras de sangre y deben identificarse. Aunque pueden ser altamente polimórficos, los criterios de identificación más característicos de dos parásitos comunes se describen a continuación. *T. lewisi* (parásito de la rata) se puede encontrar en roedores y algunas veces en muestras de primates, incluidos los humanos; se caracteriza por un gran tamaño (30 µm), un núcleo posterior, un flagelo libre, un gran cinetoplasta subterminal y una extremidad posterior muy afilada en la forma adulta en forma de C. *T. cruzi* es un parásito de tamaño mediano (16–25 µm) con núcleo central, flagelo libre, cinetoplasta sub-terminal muy grande y protuberante, y una forma adulta en forma de C o S; se debe tener en cuenta que se pueden encontrar parásitos amastigotes, especialmente en el líquido espinal y en los músculos

1.2. Técnicas de concentración de parásitos

La probabilidad de detectar tripanosomas en una muestra de un animal infectado depende en gran medida de la cantidad de sangre examinada y del nivel de parasitemia. La cantidad de sangre examinada con técnicas de análisis directo es baja y los parásitos a menudo son muy escasos en la sangre de un animal infectado. Estos dos factores contribuyen a la baja sensibilidad de las técnicas de análisis directo. Se puede mejorar la sensibilidad aumentando el volumen de sangre examinado y mediante la concentración de tripanosomas. Entre estos métodos, la técnica de centrifugación para obtener el hematocrito es la prueba de diagnóstico clásica y de referencia para la detección de tripanosomas vivos.

1.2.1. Técnica de centrifugación del hematocrito (HCT, método de Woo)

La técnica de centrifugación del hematocrito (HCT), o Woo (1970), se utiliza mucho para el diagnóstico de la tripanosomosis animal. Se basa en la separación de los diferentes componentes de la sangre dependiendo de su gravedad específica. El método se aplica de la siguiente forma:

- i) Se recoge sangre fresca generalmente de la vena auricular (alrededor 70 µl) en tubos capilares heparinizados (75 × 1,5 mm); cuando se obtiene sangre de una vena más grande en un tubo con anticoagulante, puede llenarse un tubo capilar seco.
- ii) Se sella un extremo del tubo capilar con pegamento.
- iii) Los tubos capilares sellados se colocan en una centrífuga para microhematocrito con los bordes sellados apuntando hacia el exterior. Para asegurar un buen equilibrio, se cargan los tubos simétricamente. Los tubos capilares se centrifugan a 9000 **g** durante 5 minutos.
- iv) Se prepara un portador de tubos que consiste en un portaobjetos sobre el que se han fijado dos piezas de vidrio de 25 × 10 × 1,2 mm, separadas 1,5 mm, para formar una ranura. El tubo capilar se coloca en la ranura, se pone un cubre en la parte superior y se llena de agua la interfase. Como alternativa, puede realizarse el examen sin inundar la interfase con agua, pero en este caso el condensador debe bajarse de tal forma que las células se vuelvan refringentes.
- v) Se examina la interfase del plasma y la capa leucocitaria (plaquetas y leucocitos) girando el tubo lentamente 6-7 veces unos 60 grados angulares. El movimiento del tripanosoma se puede detectar primero utilizando las lentes de objetivo ×10 con una apertura reducida del condensador; los tripanosomas pueden verse más claramente utilizando las lentes de objetivo ×40 preferiblemente a una distancia larga de trabajo para permitir una adecuada profundidad de foco a través del tubo capilar.

La HCT es más sensible que las técnicas de examen directo (Kratzer & Ondiek, 1989). En el caso de las infecciones de *T. vivax*, la sensibilidad de los métodos Woo se acerca al 100% cuando la parasitemia es >700 tripanosomas/ml de sangre. La sensibilidad se reduce hasta 50% cuando la parasitemia oscila entre 60 y 300 tripanosomas/ml de sangre. Los tripanosomas se vuelven muy difíciles de detectar cuando la parasitemia es menor de 60 tripanosomas/ml de sangre (Desquesnes, 2004). La identificación de las especies de tripanosomas es difícil. Como

la gravedad específica de *T. congolense* es similar a la de los leucocitos, los parásitos a menudo se encuentran dentro de la capa leucocitaria. Para mejorar la separación de las células sanguíneas y los parásitos, y aumentar la sensibilidad para *T. congolense*, se puede aumentar la gravedad específica de las células sanguíneas añadiendo glicerol.

1.2.2. Técnica de la capa leucocitaria en campo oscuro/contraste de fase (método de Murray)

La técnica de la capa leucocitaria (BCT) o método de Murray (Murray *et al.*, 1977) constituye una técnica mejorada para la detección de tripanosomas. Se lleva a cabo siguiendo los pasos (i) a (v) anteriores, después de los cuales se corta el tubo capilar, con un lapicero con punta de diamante, 0,5 mm por debajo de la capa leucocitaria, para incluir la capa superior de RBC. La capa leucocitaria y la capa superior de RBC se extruden sobre un porta limpio de microscopio (es importante verificar que la capa leucocitaria no se adhiera al tubo capilar, sino que debe ser visible en el porta antes de cubrirlo con un cubreobjetos [22 × 22 mm]). Antes de aplicar el cubre debe comprobarse que la capa leucocitaria no se queda adherida a la base del capilar y que queda visible sobre el porta. En unos 200 campos de la preparación se comprueba si hay tripanosomas móviles, con un microscopio de campo oscuro o de contraste de fase con una lente de objetivo ×40 (aumentos totales ×400). Las especies de tripanosoma se pueden identificar teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- i) *Trypanosoma vivax*: Grande, extremadamente activo, atraviesa el campo completo muy rápidamente, deteniéndose ocasionalmente.
- ii) *Trypanosoma brucei*: Varios tamaños, movimiento rápido en áreas limitadas; la membrana ondulante atrapa la luz en "manchas" que se desplazan por el cuerpo.
- iii) *Trypanosoma congolense*: Pequeño, lento, se adhiere a los RBC por el extremo anterior.
- iv) *Trypanosoma theileri*: Más del doble del tamaño de los tripanosomas patógenos, tiende a rotar; el extremo posterior es claramente visible, muy largo, afilado y sin duda rígido.

Igual que con la HCT, la BCT es más sensible que las técnicas directas de examen. La sensibilidad de la BCT se puede mejorar utilizando la técnica de la centrifugación doble de la capa leucocitaria (Kratzer & Ondiek, 1989). Se centrifuga una cantidad total de 1.500–2.000 µl de sangre, después de lo cual se aspira la capa leucocitaria en un tubo capilar de microhematocrito y se centrifuga de nuevo. Se examina la capa leucocitaria superior. Sin embargo, la recogida de dicha capa tras la centrifugación inicial es un paso delicado y los resultados pueden variar de una técnica a otra.

Comparada con la HCT, la BCT tiene la ventaja añadida de que las preparaciones se pueden fijar y teñir para una identificación más precisa de especies y para mantenerlas como un registro permanente. Sin embargo, la repetibilidad del método es menor que en la HCT ya que el procedimiento para dejar caer la capa leucocitaria del tubo capilar al portaobjetos es incierto y, en consecuencia, su éxito varía de un operario a otro. Con mucha frecuencia, la capa leucocitaria se adhiere a la pared del tubo capilar y, por lo tanto, puede pasarse por alto y el examen da un resultado negativo. Además, la BCT consume más tiempo que la HCT. Por esta razón, se da preferencia a la HCT como método de referencia en la práctica.

Tanto la técnica de la HCT como la BCT dan resultados directos, pero la HCT resulta mejor si se va a analizar un gran número de animales. Requieren equipo especializado y suministro de electricidad, lo que hace que la prueba sea más cara en comparación con el examen de la extensión húmeda de sangre. Sin embargo, esto se compensa con el aumento de la sensibilidad. Ambas técnicas de detección de parásitos se basan en la detección de tripanosomas móviles y vivos. Debido a que los tripanosomas pueden perder su vigor y morir bastante rápidamente una vez que se extrae la muestra de sangre, las muestras recogidas en tubos capilares deben enfriarse inmediatamente y no dejar que se sobrecalienten en la centrífuga para microhematocrito ni en la platina del microscopio. Las muestras deben examinarse tan pronto como se pueda después de recogerlas, preferiblemente en un plazo máximo de dos horas.

Las HCT y la BCT son especialmente útiles porque se puede evaluar el hematocrito (PCV) a la misma vez. Para determinar el PCV después de la centrifugación, el tubo capilar del microhematocrito (que contiene sangre de la vena auricular o de la yugular) se coloca en un lector de hematocrito. La longitud de la columna de eritrocitos concentrados + capa leucocitaria se expresa como porcentaje del volumen total de sangre. Es útil medir el PCV para determinar el grado de anemia. La anemia puede ser causada por factores diferentes de la tripanosomosis transmitida por la mosca tse-tsé. Sin embargo, sigue siendo uno de los indicadores más importantes de la tripanosomosis en el ganado vacuno. Como la tripanosomosis es un

problema de la manada, el perfil de PCV de una manada está influido por el número de animales infectados por la tripanosomosis y puede utilizarse para indicar diferencias en la exposición a la enfermedad. El PCV medio está también influido por la edad y el nivel de susceptibilidad genética del ganado vacuno.

1.2.3. Intercambio de aniones

La técnica de cromatografía de intercambio aniónico a microescala (m-AECT) se utiliza mucho para el diagnóstico de la enfermedad del sueño causada por *T.b. gambiense* en los humanos (Lumsden *et al.*, 1979). La sangre se pasa a través de una columna de dietil amino-etil (DEAE)-celulosa equilibrada con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) de una fuerza iónica ajustada a la sangre de la especie de animal examinada (Lanham & Godfrey, 1970). Como los RBC están cargados más negativamente que los tripanosomas, se mantienen en la columna y los tripanosomas pasan a través con el eluido, que se recoge, se centrifuga para concentrar los tripanosomas y se examina al microscopio.

Se pueden examinar grandes volúmenes de sangre de cada animal, por lo que el método tiene una alta sensibilidad. Sin embargo, la técnica es lenta y no es adecuada para el examen de un gran número de animales porque es cara y requiere mucho tiempo.

1.2.4. Cultivo *in-vitro*

Se ha descrito un procedimiento para el cultivo *in-vitro* de *T. brucei*, pero durante muchos años el éxito ha sido irregular. Además, el método necesita un equipamiento sofisticado, se tarda bastante en obtener los resultados y en realidad no es adecuado para su uso a gran escala. Se ha observado que un kit para el aislamiento *in-vitro* de tripanosomas da resultados prometedores para el aislamiento y amplificación de todas las especies de *T. brucei* en los humanos y en los animales domésticos y en los de caza (Truc *et al.*, 1992). El valor de la prueba en el aislamiento de *T. congolense* y *T. vivax* es entre variable y bajo. Como se basa en el cultivo de las formas procíclicas de los tripanosomas, no es posible la diferenciación de especies, sin embargo se ha descrito un método reciente para un ciclo de vida *in vitro* completo de *T. congolense* (Coustou *et al.*, 2010). Debe tenerse en cuenta que el cultivo es un método muy eficiente y sensible para la detección de *T. theileri* transmitido por tábanos, cuya prevalencia es a menudo cercana al 100% mediante esta técnica. En el caso de infecciones mixtas, es fácil que *T. theileri* crezca más (sobrecrecimientos) que *T. b. brucei* (Verloo *et al.*, 2000). Por todas estas razones, el cultivo *in-vitro* de tripanosomas no puede recomendarse para fines de diagnóstico.

1.3. Inoculación en los animales

La inoculación de roedores es cara y debe limitarse a la producción masiva de antígeno del parásito para el diagnóstico serológico; solo en circunstancias excepcionales puede utilizarse para la puesta de manifiesto y aislamiento del parásito.

Se inyectan por vía peritoneal a animales de laboratorio 0,1–0,5 ml (en función del tamaño del roedor) de sangre recién extraída. La inmunosupresión artificial de animales receptores mediante un tratamiento con radioterapia o farmacológico (ciclofosfamida a razón de 200 mg/kg) aumentará en gran medida la probabilidad de aislar el parásito. Se extrae una gota de sangre de la punta de la cola del roedor tres veces a la semana. Esta sangre se examina empleando el método de la extensión húmeda. Si se produce una infección, en general se observa pasados 3 a 10 días, aunque debe realizarse un seguimiento de los roedores por lo menos durante 1 mes.

La tasa de éxito de este método depende de la especie de *Trypanosoma* involucrada: es muy sensible para detectar infecciones causadas por *Trypanozoon* (incluido *T. evansi*), tiene una sensibilidad intermedia para las cepas de *T. congolense*, y en general es poco sensible para *T. vivax*, aunque en algunas ocasiones, infrecuentes, resulta eficaz.

1.4. Pruebas de amplificación de ADN

Se ha desarrollado un método de PCR como herramienta para el diagnóstico de infecciones por tripanosomas africanos en humanos y animales, así como en moscas tse-tsé. Se pueden amplificar secuencias específicas altamente repetitivas de ADN nuclear (también llamadas ADN satélite, que presentan entre 10.000 y 20.000 repeticiones seriadas en el genoma) para el diagnóstico de *T. vivax* y tres tipos de *T. congolense* (Desquesnes y Davila, 2002). Se dispone de un conjunto de cebadores común para la detección de todos los taxones de *Trypanozoon*, incluidos *T. brucei* spp., *T. evansi* y *T. equiperdum*. La preparación del ADN es un paso determinante; existen varios métodos, incluidos

kits comerciales (Penchenier *et al.*, 1996). De forma similar a los exámenes parasitológicos, una técnica de concentración por centrifugación permite el enriquecimiento de muestras de sangre; por lo tanto, se recomienda llevar a cabo el paso de preparación de ADN en capas leucocitarias.

A continuación se indican los conjuntos de cebadores bien validados disponibles para los diferentes subgéneros, especies y tipos de tripanosomas (Tabla 2): subgéneros de *Trypanozoon* (TBR1 y TBR2); *T. congolense* tipo sabana (TCS1 y TCS2); *T. congolense* tipo forest (TCF1 y TCF2); *T. congolense* tipo Costa de Kenia (TCK1 y TCK2); *T. simiae* (TSM1 y TSM2), y *T. vivax* (TVW1 y TVW2) (Masiga *et al.*, 1992). Existen otros conjuntos de cebadores para distinguir *T. evansi* y sus tipos A y B (Claes *et al.*, 2004; Njiru *et al.*, 2006). También hay métodos más específicos para identificar *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* (Njiru *et al.*, 2004; Picozzi *et al.*, 2008; Radwanska *et al.* 2002a, 2002b), que permiten investigar el reservorio animal de la enfermedad del sueño (Hamill *et al.*, 2013; Karshima *et al.*, 2016). Debido a la multiplicidad de estos cebadores específicos de taxones en moscas tse-tse o ganado vacuno, una identificación completa de especies de *Trypanosoma* requiere de tres a seis o más pruebas de PCR por muestra, lo que aumenta considerablemente el costo del diagnóstico. En EE.UU., también se podrían usar cebadores para la detección de *T. cruzi* (TCZ1 y TCZ2) (Moser *et al.*, 1989).

Tabla 2. Secuencias de cebadores validados para la identificación de tripanosomas animales.

Especificidad	Secuencias de los cebadores	Referencias
<i>T. brucei</i> s.l.	TBR1: 5'-CGA-ATG-AAT-ATT-AAA-CAA-TGC-GCA-G-3'	Moser <i>et al.</i> , 1989
	TBR2: 5'-AGA-ACC-ATT-TAT-TAG-CTT-TGT-TGC-3'	
<i>T. congolense</i> tipo savannah	TCS1: 5'-CGA-GCG-AGA-ACG-GGC-AC-3'	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TCS2: 5'-GGG-ACA-AAC-AAA-TCC-CGC-3'	
<i>T. congolense</i> tipo forest	TCF1: 5'-GGA-CAC-GCC-AGA-AGG-TAC-TT-3'	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TCF2: 5'-GTT-CTC-GCA-CCA-AAT-CCA-AC-3'	
<i>T. congolense</i> tipo "Kilifi"	TCK1: 5'-GTG-CCC-AAA-TTT-GAA-GTG-AT-3'	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TCK2: 5'-ACT-CAA-AAT-CGT-GCA-CCT-CG-3'	
<i>T. simiae</i>	TSM1: 5'-CCG-GTC-AAA-AAC-GCA-TT-3'	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TSM2: 5'-AGT-CGC-CCG-GAG-TCG-AT-3'	
<i>T. vivax</i>	TVW 1: 5'-CTG-AGT-GCT-CCA-TGT-GCC-AC-3'	Masiga <i>et al.</i> , 1992
	TVW 2: 5'-CCA-CCA-GAA-CAC-CAA-CCT-GA-3'	
<i>T. cruzi</i>	TCZ1: 5'-CGA-GCT-CTT-GCC-CAC-ACG-GGT-GCT-3'	Moser <i>et al.</i> , 1989
	TCZ2: 5'-CCT-CCA-AGC-AGC-GGA-TAG-TTC-AGG-3'	
Especificidad	Secuencias de otros cebadores utilizados con frecuencia	Referencias
<i>T. evansi</i>	TEPAN1: 5'-AGT-CAC-ATG-CAT-TGG-TGG-CA-3'	Panyim <i>et al.</i> , 1993
	TEPAN2: 5'-GAG-AAG-GCG-TTA-CCC-AAC-A-3'	
<i>T. evansi</i>	ESAG6/7F: 5'-ACA-TTC-CAG-CAG-GAG-TTG-GAG-3'	Holland <i>et al.</i> , 2001
	ESAG6/7R: 5'-CAC-GTG-AAT-CCT-CAA-TTT-TGT-3'	
<i>T. evansi</i> (tipo A)	RoTat1.2F: 5'-GCG-GGG-TGT-TTA-AAG-CAA-TA-3'	Claes <i>et al.</i> , 2004
	RoTat1.2R: 5'-ATT-AGT-GCT-GCG-TGT-GTT-CG-3'	
<i>T. evansi</i> (tipo B)	EVAB1: 5'-CAC-AGT-CCG-AGA-GAT-AGA-G-3'	Njiru <i>et al.</i> , 2006
	EVAB2: 5'-CTG-TAC-TCT-ACA-TCT-ACC-TC-3'	
<i>T. brucei gambiense</i>	Tgs-GP F: 5'-GCT-GCT-GTG-TTC-GGA-GAG-C-3'	Radwanska <i>et al.</i> , 2002a
	TgsGP R: 5'-GCC-ATC-GTG-CTT-GCC-GCT-C-3'	
<i>T. brucei rhodesiense</i>	Tbr F: 5'-ATA-GTG-ACA-AGA-TGC-GTA-CTC-AAC-GC-3'	Radwanska <i>et al.</i> , 2002b
	Tbr R: 5'-AAT-GTG-TTC-GAG-TAC-TTC-GGT-CAC-GCT-3'	

Especificidad	Secuencias de otros cebadores utilizados con frecuencia	Referencias
Pan-tripanosomas: <i>T. brucei</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. congolense</i> forest, savannah, Kilifi, <i>T. evansi</i> , <i>T. lewisi</i>	TRYP1S: 5'-CGT-CCC-TGC-CAT-TTG-TAC-ACA-C-3'	Desquesnes <i>et al.</i> , 2002
	TRYP1R: 5'-GGA-AGC-CAA-GTC-ATC-CAT-CG-3'	
Pan- tripanosomas: <i>T. brucei</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T. congolense</i> forest, savannah, Kilifi, <i>T. evansi</i>	ITS1 CF: 5'-CCG-GAA-GTT-CAC-CGA-TAT-TG-3'	Njiru <i>et al.</i> , 2005
	ITS1 BR: 5'-TTG-CTG-CGT-TCT-TCA-ACG-AA-3'	

También se han desarrollado ampliaciones de ITS1 de ADN ribosómico que permiten la identificación de todas las especies de *Trypanosoma* como infecciones únicas o mixtas usando una sola prueba (Desquesnes *et al.*, 2001, Desquesnes y Davila, 2002; Njiru *et al.*, 2005). Estas pruebas son útiles para el cribado, sin embargo, el tamaño del producto o los productos de la PCR en geles a veces no es fiable, y por lo tanto, para confirmar la identificación de especies se requiere con mayor frecuencia la secuenciación, que no es adecuada para el diagnóstico de rutina. La amplificación isotérmica mediada por bucle también se ha desarrollado para el diagnóstico de tripanosoma (Kuboki *et al.*, 2003), sin embargo, hasta ahora su uso limitado no permitía una validación completa para fines veterinarios.

Se llevan a cabo ampliaciones por PCR monovalente en una mezcla de reacción que contiene Tris/HCl, MgCl₂, KCl, así como desoxirribonucleótidos trifosfatos, cebadores, molde de ADN y ADN polimerasa Taq. Las muestras se incuban durante 30 ciclos a temperaturas variables. Los productos de la PCR se someten a electroforesis a través de agarosa. Los geles se tiñen con bromuro de etidio u otra tinción para gel de ácido nucleico y se visualizan bajo luz UV para determinar la presencia de productos del peso específico.

El procedimiento es extremadamente sensible, pero pueden producirse falsos positivos como resultado de la contaminación de muestras con ADN de tripanosoma. La prueba requiere equipo especializado y personal altamente capacitado, por lo que no es adecuada en muchos laboratorios. Pueden aparecer falsos negativos cuando la parasitemia es muy baja (<1 tripanosoma/ml de sangre), lo cual tiene lugar con frecuencia en infecciones crónicas. También pueden aparecer falsos negativos cuando la especificidad de los cebadores es demasiado alta, de modo que no se reconocen todas las cepas de una especie particular de tripanosoma. La obtención de muestras se ha simplificado adaptando la prueba al uso de sangre o capas leucocitarias sobre papel de filtro (Katakura *et al.*, 1997); hoy en día, tales métodos son muy valorados, especialmente para el envío internacional de muestras. Permiten procesar una gran cantidad de muestras a la vez, lo que los hace potencialmente adecuados para estudios a gran escala.

Se pueden obtener muestras de referencia de ADN específicas para las PCR del Laboratorio de Referencia de la OIE para la tripanosomosis de origen africano (CIRAD, Montpellier) y del Laboratorio de Referencia de la OIE para la surra (ITM, Anvers).

2. Pruebas serológicas

Se han elaborado varias técnicas para la detección de anticuerpos tripanosómicos para el diagnóstico de la tripanosomosis animal, con sensibilidad y especificidad variable. Los métodos preferidos son la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) (Katende *et al.*, 1987) y el ELISA para la detección de anticuerpos tripanosómicos (Hopkins *et al.*, 1998; Luckins, 1977). La identificación de los principales antígenos de tripanosoma, y su producción como moléculas recombinantes o péptidos sintéticos, es esperable que actualmente conduzca al desarrollo y la validación de nuevas pruebas basadas en el empleo de moléculas definidas. Por tanto, en un futuro próximo, podría mejorarse la especificidad de las pruebas serológicas hasta permitir la detección de anticuerpos específicos de especie, y alcanzar un alto nivel de estandarización que no se logra actualmente mediante la utilización de extractos totales de parásitos. Como alternativa, existen técnicas mejoradas para la producción *in-vitro* de estadios sanguíneos de diversas *Trypanosoma* spp. que son muy prometedoras, ya que permitirán la producción de antígenos solubles de lisado de células enteras estandarizados, lo que garantiza una alta sensibilidad debido al rico panel de antígenos nativos que exhiben. En 2017, el ELISA para *T. congolense* savannah, el ELISA para *T. vivax* y el ELISA para *T. b. brucei* son los métodos recomendados para la detección de anticuerpos anti-tripanosoma en la mayoría de las especies hospedadoras afectadas por nagana.

2.1. Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Esta técnica para la preparación de antígenos de tripanosomas (Katende *et al.*, 1987), implica la fijación de los tripanosomas vivos utilizando una mezcla de 80% de acetona fría y formalina al 0,25% en solución salina normal.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se preparan frotis finos a partir de sangre con una gran parasitemia o de una suspensión de tripanosomas. Se secan al aire y se fijan en acetona durante 5 minutos.
- ii) Se marcan círculos de 5 mm de diámetro sobre portas de vidrio utilizando laca de uñas.
- iii) Utilizando una pipeta, se coloca un suero problema, diluido al 1/40, en cada círculo, asegurándose de que el área de cada círculo esté completamente cubierta.
- iv) Se incuba la preparación del suero problema y del antígeno a 37°C durante 30 minutos en una cámara húmeda.
- v) Se lava la preparación tres veces en PBS durante 5 minutos cada vez a 4°C, con agitación suave. Se secan los portas al aire.
- vi) Se aplica un conjugado: anticuerpo anti IgG bovina generada en conejo o cabra (para pruebas con sueros bovinos) conjugada con isotiocianato de fluoresceína.
- vii) Se incuba y se lava como anteriormente. Se enjuaga en agua destilada. Se secan los portas al aire.
- viii) Se montan los portas en PBS o glicerol tamponado y se comprueba si aparece fluorescencia.

La interpretación de la fluorescencia sigue siendo subjetiva y el procedimiento no se adapta a estudios a gran escala; por lo tanto, en general se utiliza IFAT para el diagnóstico individual como alternativa al ELISA.

2.2. Enzimoimmunoanálisis de detección de anticuerpos

Se ha elaborado un ELISA original para la detección de anticuerpos (Luckins, 1977) para su utilización en estudios de la tripanosomosis bovina a gran escala (Desquesnes, 1997; Hopkins *et al.*, 1998). Se han hecho recomendaciones que permiten la producción de antígeno y la estandarización de la prueba a nivel local (Desquesnes, 1997; 2004; Greiner *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1993).

El antígeno estándar para las pruebas de anticuerpos contra la tripanosomosis deriva de los tripanosomas tomados del torrente circulatorio producidos en ratas de laboratorio. Los antígenos se purifican sometiendo parásitos de sangre total de ratas infectadas a una cromatografía de intercambio aniónico DEAE (Lanham & Godfrey 1970). Los antígenos se preparan en forma de fracción soluble con lisis (añadiendo anti-enzima) mediante cinco a siete ciclos de congelación-descongelación (o sonicación) y por centrifugación a 10.000 *g* durante 10 minutos; el sobrenadante contiene antígenos solubles a los que debe añadirse un cóctel inhibidor de la proteasa y deben conservarse a -80°C o a -20°C, según si se guardan durante periodos largos o cortos, respectivamente. Como alternativa, pueden liofilizarse antígenos solubles para su conservación a temperatura ambiente o para el envío internacional de reactivos estandarizados. Se han desarrollado pruebas de ELISA utilizando placas de microtitulación previamente antigenizadas con *T. congolense* o *T. vivax*, que presentan la ventaja de que se utiliza un antígeno desnaturalizado estandarizado y que se pueden almacenar durante largos periodos a temperatura ambiente (Rebeski *et al.*, 2000), no obstante, la sensibilidad y la especificidad de la prueba son más bajas. Es esperable que en un futuro próximo se disponga de un método bien estandarizado y con buen rendimiento, con producción *in-vitro* de tripanosomas de forma sanguínea.

Para el análisis de muestras de sangre recogidas sobre papel de filtro se han adaptado tanto la IFAT como el ELISA de detección de anticuerpos. Se depositan 30–100 µl de muestra de suero o de plasma sobre un papel de filtro. Las muestras se secan al aire protegidas de la luz solar y se colocan en una bolsa de plástico con desecador de gel de sílice con un autoindicador. La bolsa se cierra y debe mantenerse lo más fría posible hasta que las muestras se refrigieren o congelen. Se está llevando a cabo una mayor validación de esta técnica, porque estos métodos facilitan mucho el envío de muestras a nivel internacional.

Cada microplaca ELISA se ejecuta con sueros de referencia fuertemente positivos, medianamente positivos, débilmente positivos y negativos por duplicado, que se requieren para cumplir con los valores predeterminados para asegurar la calidad de la prueba. La absorbancia de cada muestra

analizada mediante el ELISA se expresa como un porcentaje (porcentaje de positividad, PP) del estándar de referencia fuertemente positivo (Wright *et al.*, 1993) o los estándares positivos y negativos de referencia (Desquesnes, 1997). Los resultados son, por tanto, cuantificables. El valor límite se determina utilizando muestras de campo o experimentales que se sepa que son positivas o negativas (Desquesnes, 1997; 2004).

Ambas pruebas de detección de anticuerpos tienen una alta sensibilidad y una alta especificidad de género. Generalmente su especificidad de especie es baja, pero puede mejorarse empleando un juego estandarizado de tres pruebas que son específicas de especie (Desquesnes *et al.*, 2011). Estas detectan respuestas inmunitarias a las infecciones actuales y pasadas y pueden, consecuentemente, proporcionar solamente un diagnóstico preliminar de infección activa. Sin embargo, se estima que la persistencia de anticuerpos tras un tratamiento curativo o por autocuración dura una media de 3–4 meses en las infecciones del ganado vacuno joven y adulto (Desquesnes, 2004); aunque podrían tener que transcurrir hasta 13 meses para la completa desaparición de los anticuerpos en algunos animales (Van den Bossche *et al.*, 2000). Por tanto, un muestreo adecuado y un conocimiento del uso de agentes anti-tripanosomas proporcionará una información más adecuada.

Para el inmunodiagnóstico, se requiere la producción de antígenos nativos y se necesita un equipo caro y sofisticado, además de experiencia, lo que no siempre está disponible. Ha de llevarse a cabo en laboratorios especializados y hay un retraso sustancial entre el muestreo real y la disponibilidad de los resultados. Sin embargo, el ELISA para anticuerpos se presta a un alto grado de automatización y estandarización. La recogida y el almacenamiento de muestras se llevan a cabo fácilmente mediante el uso de papeles de filtro. Todos estos factores hacen del ELISA para anticuerpos una prueba muy útil en estudios a gran escala para determinar la distribución de la tripanosomosis transmitida por la mosca tse-tsé, así como para el seguimiento post-tratamiento.

Los antígenos específicos para ELISA y las muestras de referencia (muestras de suero de referencia positivas y negativas) pueden obtenerse del Laboratorio de Referencia de la OIE para las tripanosomosis animales de origen africano.

Las pruebas recomendadas para el diagnóstico de las tripanosomosis son las siguientes: GSBS, HCT, PCR con cebadores satelitales (Masiga *et al.*, 1992) y ELISA con antígenos solubles de lisados de células enteras de *T. congolense savannah*, *T. vivax* y *T. brucei brucei*.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

En la actualidad no se utilizan vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

BALDACCCHINO F., DESQUESNES M., MIHOK S., FOIL L.D., DUVALLET G. & JITTAPALAPONG S. (2014). Tabanids: neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infect. Genet. Evol.*, **28**, 596–615.

BENGALY Z., SIDIBE I., GANABA R., DESQUESNES M., BOLY H. & SAWADOGO L. (2002). Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet. Parasitol.*, **108**, 1–19.

BRYAN L.K., HAMER S.A., SHAW S., CURTIS-ROBLES R., AUCKLAND L.D., HODO C.L., CHAFFIN K. & RECH R.R. (2016). Chagas disease in a Texan horse with neurologic deficits. *Vet. Parasitol.*, **216**, 13–17.

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

DESQUESNES M. (1997). Standardisation internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques: méthode, intérêts et limites. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **16**, 809–823.

DESQUESNES M. (2004). Livestock Trypanosomoses and their Vectors in Latin America. OIE and CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement). World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, France, 192 pp.

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

- DESQUESNES M., MCLAUGHLIN G., ZOUNGRANA A. & DAVILA A.M.R. (2001). Detection and identification of *Trypanosoma* of African livestock through a single PCR based on internal transcribed spacer 1 of rDNA. *Int. J. Parasitol.*, **31**, 610–614.
- DESQUESNES M., RAVEL S. & CUNY, G. (2002). PCR identification of *Trypanosoma lewisi*, a common parasite of laboratory rats. *Kinetoplastid Biol. Dis.*, **1**, 2.
- DESQUESNES M., RAVEL S., DESCHAMPS J.-Y., POLACK B. & ROUX F. (2012). Atypical hyperpachymorph *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense* forest-type in a dog returning from Senegal. *Parasite*, **19**, 239–247.
- GREINER M., KUMAR S. & KYESWA C. (1997). Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. *Vet. Parasitol.*, **73**, 197–205.
- HAMILL L., KAARE M., WELBURN S. & PICOZZI K. (2013). Domestic pigs as potential reservoirs of human and animal trypanosomiasis in Northern Tanzania. *Parasit. Vectors*, **6**, 322.
- HOLLAND W.G., CLAES F., MY L.N., THANH N.G., TAM P.T., VERLOO D., BUSCHER P., GODDEERIS B. & VERCRUYSSSE J. (2001). A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Vet. Parasitol.*, **97**, 23–33.
- HOLMES P. (2015). On the road to elimination of Rhodesiense human African trypanosomiasis: first WHO meeting of stakeholders. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **9**, e0003571.
- HOPKINS J.S., CHITAMBO H., MACHILA N., LUCKINS A.G., RAE P.F., VAN DEN BOSSCHE P. & EISLER M.C. (1998). Adaptation and validation of the antibody trapping ELISA using dried blood spots on filter paper, for epidemiological surveys of tsetse transmitted trypanosomosis in cattle. *Prev. Vet. Med.*, **37**, 91–99.
- KATAKURA K., LUBINGA C., CHITAMBO H. & TRADA Y. (1997). Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. *Parasitol. Res.*, **83**, 241–245.
- KATENDE J.M., MUSOKE A.J., NANTULYA V.M. & GODDEERIS B.M. (1987). A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. *Trop. Med. Parasitol.*, **38**, 41–44.
- KARSHIMA S.N., AJOGI I. & MOHAMMED G. (2016). Eco-epidemiology of porcine trypanosomosis in Karim Lamido, Nigeria: prevalence, seasonal distribution, tsetse density and infection rates. *Parasit. Vectors*, **9**, 448.
- KUBOKI N., INOUE N., SAKURAI T., DI CELLO F., GRAB D.J., SUZUKI H., SUGIMOTO C. & IGARASHI I. (2003). Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5517–5524.
- LANHAM S.M. & GODFREY D.G. (1970). Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-Cellulose. *Exp. Parasitol.*, **28**, 521–534.
- LUCKINS A.G. (1977). Detection of antibodies in trypanosome infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop. Anim. Health Prod.*, **9**, 53–62.
- LUMSDEN W.H.R., KIMBER C.D., EVANS D.A. & DOIG S.J. (1979). *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **73**, 312–317.
- 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.
- MOSER D.R., KIRCHHOF L.V. & DONELSON J.E. (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 1477–1482.
- MURRAY M., MURRAY P.K. & MCINTYRE W.I.M. (1977). An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **71**, 325–326.
- NJIRU Z. K., CONSTANTINE C.C., GUYA S., CROWTHER J., KIRAGU J.M., THOMPSON R.C. & DAVILA A.M. (2005). The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol. Res.*, **95**, 186–192.
- NJIRU Z. K., NDUNG’U K., MATETE G., NDUNGU J.M. & GIBSON W.C. (2004). Detection of *Trypanosoma brucei* rhodesiense in animals from sleeping sickness foci in East Africa using the serum resistance associated (SRA) gene. *Acta Trop.*, **90**, 249–254.
- NJIRU Z.K., CONSTANTINE C.C., MASIGA D.K., REID S.A., THOMPSON R.C. & GIBSON W.C. (2006). Characterization of *Trypanosoma evansi* type B. *Infect. Genet. Evol.*, **6**, 292–300.
- PANYIM S., VISESHAKUL N., LUXANANIL P., WUYTS N. & CHOKESAJJAWATEE N. (1993). A PCR method for highly sensitive detection of *Trypanosoma evansi* in blood samples. Proceedings of EEC contractants workshops,

“Resistance or tolerance of animals to diseases and veterinary epidemiology and diagnostic methods”, Rethymno, Greece, 2–6 November 1992; ed CIRAD-EMVT, 138–143.

PARIS J., MURRAY M. & MCOIDIMBA F. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop.*, **39**, 307–316.

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

PICOZZI K., CARRINGTON M. & WELBURN S.C. (2008). A multiplex PCR that discriminates between *Trypanosoma brucei brucei* and zoonotic *T. b. rhodesiense*. *Exp. Parasitol.*, **118**, 41–46.

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

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

REBESKI D.E., WINGER E.M., OKORO H., KOWALIK S., BURGER H.J., WALTERS D.E., ROBINSON M.M., DWINGER R.H. & CROWTHER J.R. (2000). Detection of *Trypanosoma congolense* antibodies with indirect ELISAs using antigen-precoated microtitre plates. *Vet. Parasitol.*, **89**, 187–198.

TOURE S.M. (1976). Diagnostic des trypanosomiasis animales. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **30**, 1–10.

TRUC P., AERTS D., MCNAMARA J.J., CLAES Y., ALLINGHAM R., LE RAY D. & GODFREY D.G. (1992). Direct isolation *in vitro* of *Trypanosoma brucei* from man and other animals, and its potential value for the diagnosis of Gambian trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **86**, 627–629.

TRUC P., BUSCHER P., CUNY G., GONZATTI M.I., JANNIN J., JOSHI P., JUYAL P., LUN Z.R., MATTIOLI R., PAYS, E., SIMARRO P.P., TEIXEIRA M.M., TOURATIER L., VINCEDEAU P. & DESQUESNES M. (2013). Atypical human infections by animal trypanosomes. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **7**, e2256.

VAN DEN BOSSCHE P., CHIGOMA D. & SHUMBA W. (2000). The decline of anti-trypanosomal antibody levels in cattle after treatment with trypanocidal drugs and in the absence of tsetse challenge. *Acta Trop.*, **77**, 263–270.

VERLOO D., BRANDT J., VAN MEIRVENNE N. & BÜSCHER P. (2000). Comparative *in vitro* isolation of *Trypanosoma theileri* from cattle in Belgium. *Vet. Parasitol.*, **89**, 129–132.

WOO P.T.K. (1970). The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.*, **27**, 384–386.

WRIGHT P.F., NILSSON E., VAN ROOIJ E.M.A., LELENTA M. & JEGGO M.H. (1993). Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12**, 435–450.

*

* *

N.B. Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para las Tripanosomosis de origen africano

(consúltese en la tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o la página web de la OIE:

<http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Para más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para las Tripanosomosis de origen africano (transmitida por la mosca tse-tsé), por favor contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991 COMO TRIPANOSOMOSIS: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.