



Penggunaan Empat Set Primer dalam Mendeteksi *Trypanosoma Evansi* pada Organ Mencit dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

(*The Use of Four Primer Sets in Detecting Trypanosoma Evansi in Mice Organs using the Polymerase Chain Reaction (PCR) Technique*)

Dias Aprita Dewi¹, Fitriane Ekawasti², April H. Wardhana², Dyah H. Sawitri²

¹Jurusan Peternakan Politeknik Pembangunan Pertanian Yogyakarta Magelang, Jl. Magelang-Kopeng KM.7, Kotak Pos 152, Magelang 56101

²Kelti Parasitologi Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. RE. Martadinata No.30, Bogor 16124

ARTICLE INFO

Received: 24 November 2019
Accepted: 30 Desember 2019

*Corresponding author
diasaprita@pertanian.go.id

Keywords:
Mice
PCR
primer
Trypanosoma evansi

ABSTRACT

The aim of the current study was to examine four primer sets for the detection of *T. evansi* on mice. Namely ITS 1, ESAG 6/7, RoTat 1,2 VSG, and TBR 1/2. Balitvet Culture Collection (BCC) – Bangkalan isolate of *T. evansi* injected into a male DDY strain mice. Three days after infection, micewas killed and some tissues (brain, liver, lung, heart, spleen, and kidney) were removed from mice and preserved into 80% Ethanol and then they were stored at 20°C. Isolated DNA from all specimens were amplified using four primer sets and repeated twice. The results demonstrated that all primers (ITS 1, ESAG 6/7, RoTat 1,2 VSG, and TBR 1/2) were able to detect *T. evansi* on all tissues samples. In order to detect *T. evansi* in the field, primer ITS-1 is recommended because its ability to distinguish some spesies of *T. evansi* in livestock and generate a good intensity of DNA band from tested samples.

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah menguji empat set primer untuk mendeteksi *T. evansi* pada mencit. Primer yang digunakan adalah ITS 1, ESAG 6/7, RoTat 1,2 VSG, dan TBR 1/2. Isolat *T. evansi* dari Balitvet Culture Collection (isolat Bangkalan) disuntikkan ke seekor mencit jantan strain DDY. Tiga hari pasca infeksi mencit dinekropsi dan dikoleksi organ otak, hati, paru, jantung, limpa dan ginjal. Organ-organ tersebut disimpan dalam etanol 80% pada suhu -20°C. DNA yang telah diisolasi dari spesimen tersebut kemudian diamplifikasi dengan empat pasang primer dengan dua ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa primer yang digunakan dalam penelitian ini (ITS1, ESAG 6/7, RoTat 1.2 VSG, dan TBR 1/2) mampu mendeteksi *T. evansi* pada semua jenis spesimen organ mencit yang diinfeksi *T. evansi*. Untuk kepentingan diagnosis, keempat set primer dapat direkomendasikan untuk kepentingan diagnosa *Trypanosoma* pada ternak karena menghasilkan pita DNA dengan intensitas yang baik.

Kata Kunci:
Mencit
PCR
Primer
Trypanosoma evansi

1. Pendahuluan

Trypanosomiasis atau Surra merupakan salah satu jenis penyakit strategis yang menyerang hewan ternak dan domestik lainnya di Indonesia yang disebabkan oleh *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) (Sawitri *et al.* 2015) dan ditularkan secara mekanis oleh vektor lalat penghisap darah seperti *Tabanus* dan *Stomoxys* spp. *T. evansi* merupakan *Trypanosoma* patogen yang penyebarannya paling luas secara geografis (Desquesnes *et al.* 2013).

Trypanosoma evansi mempunyai inang yang beragam dari hewan liar sampai hewan domestik yang mempunyai nilai ekonomi yang penting dengan berbagai tingkat kerentanan yang berbeda. Diantara hewan domestik yang rentan adalah kuda, sapi, kerbau, kambing, domba, babi, anjing, dan kucing, sedangkan hewan liar yang rentan diantaranya adalah badak (Anderson *et al.* 2011), rusa (Adrian *et al.* 2010), wallaby (Thompson *et al.* 2014) dan bisa berpotensi sebagai sumber infeksi untuk hewan domestik (N'Djetchi *et al.* 2017). Hewan coba seperti tikus dan mencit juga sangat peka terhadap infeksi *T. evansi* (OIE, 2009). Inokulasi pada mencit (*mouse inoculation*) sebagai salah satu hewan coba yang sensitif terhadap surra merupakan metode yang sensitif untuk mendeteksi penyakit surra kronis dan sudah banyak dibuktikan oleh para ahli (Herrera *et al.* 2018; Ndungu *et al.* 2019). Inokulasi pada mencit dapat dipakai untuk propagasi *T. evansi* untuk keperluan penelitian lebih lanjut seperti uji PCR untuk deteksi dan identifikasi *T. evansi*.

Diagnosa Surra sering terjadi kesalahan karena rendahnya sensitivitas dan spesifisitas uji serologis, uji parasitologis di lapang, maupun uji patologi klinik dan perubahan yang terjadi pada pengamatan post mortem. Hal ini dikarenakan tingkat parasitemia yang berfluktuasi khususnya pada tahap infeksi kronis. Oleh karena itu diperlukan teknologi yang lebih sensitif dan spesifik (Baticados *et al.* 2011).

Teknik PCR telah banyak diterapkan untuk mendeteksi trypanosomiasis di sejumlah inang dengan tingkat sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Desquesnes *et al.* 2013). Teknik ini dapat mendeteksi 1 trypanosoma/ml darah atau 1 pg DNA *Trypanosoma* dalam DNA hospes (Njiru *et al.* 2011). Faktor yang mempengaruhi diagnosa dengan teknik PCR dapat optimal antara lain kuantitas dan kualitas DNA, proses ekstraksi DNA, level parasitemia dalam tubuh inang dan desain primer yang sesuai (Musaya *et al.* 2017; Ramírez-Iglesias *et al.* 2017).

Variasi sensitifitas dan spesifitas yang tepat pada diagnostik PCR tergantung pada jenis

primer yang digunakan (Stadhouders *et al.* 2010; Njiru 2011; Ahmed 2013). Banyak penanda molekuler yang digunakan untuk mendeteksi, membedakan dan mempelajari spesies *Trypanosoma*. Primer yang didesain dengan baik akan memiliki kesesuaian antara primer dengan sekuen target serta jumlah kopi dari sekuen target yang terpresentasi dengan tepat di dalam genom parasit sehingga produk amplifikasi melalui proses PCR akan tinggi dan tepat (Musaya *et al.* 2017; Ramírez-Iglesias *et al.* 2017).

DNA untuk teknik PCR dapat diekstraksi dari sampel darah dan organ. Sampel darah dapat berupa darah segar maupun darah kering. Kertas saring sebagai media darah kering dapat diperiksa menggunakan PCR untuk mendeteksi DNA *T. evansi*. Penggunaan kertas saring selain lebih cepat dan nyaman, pengiriman sampel darah menjadi lebih mudah terutama di daerah terpencil (Wuryastuti *et al.* 2016; Dargantes 2010).

Beberapa primer untuk mendeteksi *Trypanosoma evansi* telah dilaporkan. Primer yang didesain menggunakan sekuen DNA berulang sebagai sekuen target diantaranya TBR 1/2 yang mengamplifikasi kromosom mini satelit (Symula *et al.* 2012). Primer ESAG 6/7 ditujukan untuk mengkode kompleks heterodimer pada reseptor transferin (Sawitri and Wardhana, 2018; Kariuki *et al.* 2019). Primer ITS 1 ditujukan untuk mengamplifikasi *internal transcribed spacer* rDNA (Desquesnes, 2013) sedangkan RoTat 1.2 VSG (*Variable Surface Glicoprotein*) digunakan untuk mengamplifikasi sekuen VSG cDNA (Salim *et al.* 2011; Devi *et al.* 2018). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan empat set primer yang digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi *T. evansi* pada sampel organ mencit pasca diinfeksi *T. evansi* isolat patogen.

2. Materi dan Metode

2.1. Isolat *Trypanosoma evansi*

Isolat *T. evansi* diperoleh dari *Balivet Culture Collection* (BBC) dengan nomor P0 176. Isolat tersebut dikoleksi dari darah kerbau pada tahun 1988 di Kabupaten Bangkalan, Madura, provinsi Jawa Timur dan disimpan di dalam kriopreservasi nitrogen cair.

2.2. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah seekor mencit DDY jantan berumur 2-3 bulan dengan bobot badan 25-30 g. Hewan tersebut diadaptasikan selama 10 hari dan diterapi dengan obat cacing, antibiotik dan anti protozoa.

Selama masa penelitian, hewan coba diberi pakan pelet komersial dan minum secara *ad libitum*. Sekam sebagai alas kandang (*litter*) diautoklaf terlebih dahulu agar bebas dari kontaminan biologis lainnya.

2.3. Perbanyakan *T. evansi* dan Inokulasi pada Hewan Coba

Perbanyakan *T. evansi* pada hewan coba bertujuan untuk menyediakan stok isolat yang akan digunakan untuk penelitian dalam jumlah yang melimpah, yaitu dengan cara *passage* pada mencit. Stabilitat *T. evansi* dari dalam nitrogen cair di-thawing terlebih dahulu. Selanjutnya, stabilitat diencerkan dengan *Phosphate Buffer Saline Glucose* (PBSG) (Sigma-Aldrich, Germany) pH 8 hingga 0,2 mL dan diinfeksi ke mencit jantan (strain DDY) sebanyak 0,1 mL/mencit secara *intrapertoneal* (i.p). Tingkat parasitemia diamati setiap hari dengan cara melakukan pemeriksaan natif melalui pemotongan ekor

2.4. Koleksi Organ Hewan Coba

Seekor hewan coba dinekropsi dan spesimen organ dikoleksi, antara lain otak, hati, paru, jantung, limpa dan ginjal. Masing-masing organ dimasukkan ke dalam kontainer plastik yang berisi ethanol 80%.

2.5. Ekstraksi DNA

2.5.1. Ekstraksi DNA sampel Organ

Ekstraksi DNA dilakukan terhadap organ mencit yang telah diinfeksi isolat patogen *T. evansi*. Sebelum diekstraksi organ disimpan dalam ethanol 80% kemudian dicuci dengan akuades steril sebanyak 3 kali dengan interval waktu 5 menit. Organ dipotong dengan berat sekitar 30 mg kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml. Organ digerus menggunakan *micropestle*. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit komersial *Genomic DNA Mini Kit for tissues* (Geneaid, Indonesia) sesuai prosedur perusahaan. Seluruh hasil ekstraksi genom DNA pada masing-masing jenis sampel digunakan sebagai cetakan (*template*) fragmen DNA yang akan diamplifikasi.

2.5.2. Aplikasi Uji PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) dilakukan dengan menggunakan KAPA 2G™ PCR Kit (Kapa Biosystems, United States) dalam 25 µl total campuran reaksi. Campuran reaksi terdiri dari primer Forward, primer Reverse masing-masing 25pmol (2 µl), DNA template 25 ng (2 µl) dan ddH₂O 2.5 µl. Sekuen urutan basa primer dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Urutan basa primer untuk mengamplifikasi DNA *T. evansi*

Target	Primer	Urutan Basa	Ukuran Amplikon (bp)	Pustaka
ESAG 6/7	<i>forward</i>	5'-CATTCCAGCAGGAGTTGGAGG-3'	740	Isobe et al. 2003
	<i>reverse</i>	5'-TTGTTCACTCACTCCTCTCTTTGACAG-3'		
ITS1	<i>forward</i>	5'-CCGGAAGTTCACCGATATTG-3'	480	Njiru, 2005
	<i>reverse</i>	5'-TGCTGCGTTCTTCAACGAA-3'		
RoTat 1.2 VSG	<i>forward</i>	5'-CTGAAGAGGTTGGAAATGGAGAAG-3'	151	Salim et al. 2011
	<i>reverse</i>	5'-GTTTCGGTGGTTCTGTTGTTGTTA-3'		
TBR 1/2	<i>forward</i>	5'-GAATATTAAACAATGCGCAG-3'	164	Masiga et al. 1992
	<i>reverse</i>	5'-CCATTATTAGCTTTGTTGC-3'		

Amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan dengan kondisi berikut: denaturasi awal suhu 95°C selama 30 menit, diikuti dengan denaturasi pada suhu 95°C selama 20 detik, *annealing* pada suhu 57°C selama 30 detik, *elongation* pada suhu 72°C selama 30 detik sebanyak 35 siklus, dan kemudian diakhiri dengan *post elongation* selama 20 detik pada suhu 72°C.

3. Hasil dan Pembahasan

Isolat *T. evansi* yang digunakan pada penelitian ini telah diuji patogenitasnya dan tergolong kedalam kelompok isolat yang patogen karena mampu membunuh hewan coba kurang

Hasil produk PCR dari fragmen-fragmen DNA yang diamplifikasi dengan primer-primer yang berbeda kemudian dielektroforesis pada gel *agarose* 1.5% selama 30 menit pada 100 volt. Pita DNA yang terbentuk diamati di atas UV *transilluminator*.

dari satu minggu. Kematian yang disebabkan oleh isolat ini juga cenderung serentak pasca puncak tingkat parasitemia, berbeda dengan isolat non patogen yang memiliki profil parasitemia yang fluktuatif. Isolat Bangkalan

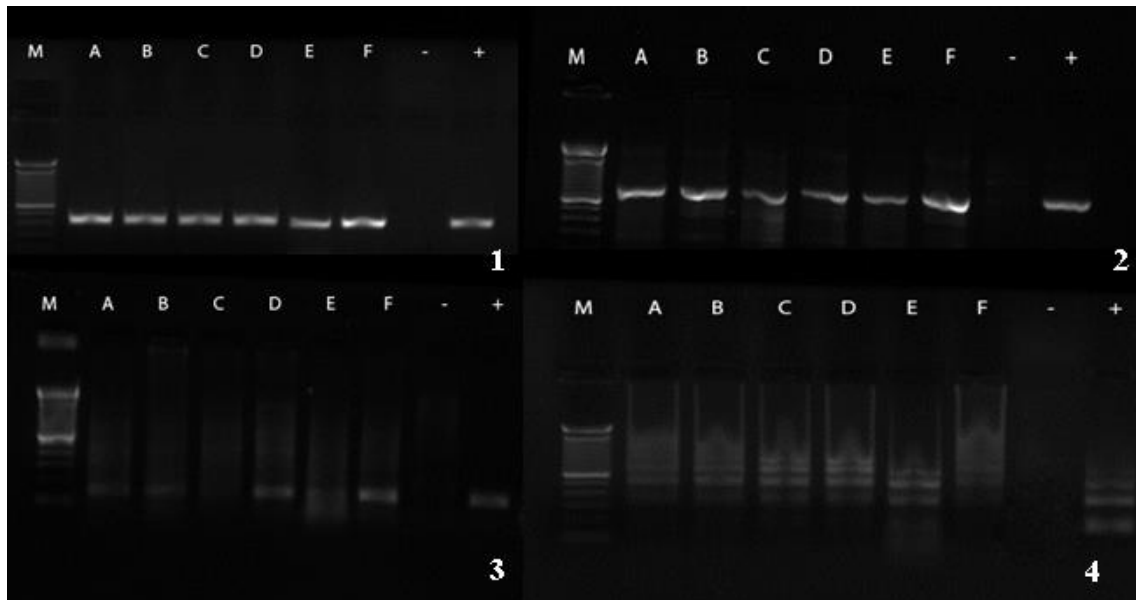
dipilih sebagai isolat *T. evansi* yang diuji molekuler pada penelitian ini karena karakteristiknya yang seragam pada hewan coba.

Hasil uji PCR pada pada ketiga jenis sampel sediaan yang mengandung *T. evansi* dengan berbagai macam primer dapat dilihat pada Tabel 2. Seluruh sampel dapat teramplifikasi dengan baik meskipun menggunakan kondisi PCR yang sama. Perbedaan diantara hasil produk terletak dari ketebalan pita DNA yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan konsentrasi pada masing-masing ekstrak genom DNA berbeda (Gambar 2).

Tabel 2. Hasil uji PCR pada jenis sampel yang berbeda dan diamplifikasi menggunakan lima set primer

Jenis Spesimen	ITS 1	RoTat 1,2 VSG	TBR 1/2	ESAG 6/7
Organ	Otak	+	+	+
		+	+	+
	Hati	+	+	+
		+	+	+
	Paru	+	+	+
		+	+	+
	Jantung	+	+	+
		+	+	+
	Limpa	+	+	+
		+	+	+
	Ginjal	+	+	+
		+	+	+

Pita DNA dari fragmen DNA dengan primer ITS 1 terletak di posisi 480 bp. Desquesnes, *et al.* (2013) melaporkan bahwa primer ITS 1 mampu mengidentifikasi beberapa spesies *Trypanosoma* karena memiliki variasi ukuran untuk spesies tertentu. Panjang produk PCR ITS1 pada beberapa spesies *Trypanosoma* antara lain 700 bp untuk *T. congolense savannah*, 400 bp untuk *T. Simiae*, 250 bp untuk *T. vivax* dan 480 bp untuk *T. evansi*. Ukuran panjang fragmen ITS 1 *T. evansi* sama dengan ukuran fragmen DNA *T. brucei sub spesies* (Sawitri *et al.*, 2015). Primer ini telah banyak digunakan untuk studi molekuler epidemiologi pada trypanosomiasis Afrika yang patogen (Salim *et al.* 2011). Primer ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan primer yang lain, yaitu dapat menggambarkan produk PCR yang berbeda apabila dalam sebuah sampel terjadi dua atau lebih spesies *Trypanosoma* yang menginfeksi ternak. Njiru *et al.* (2011) menyatakan bahwa primer ITS 1 mampu mengidentifikasi spesies *Trypanosoma* secara simultan pada sampel yang diinfeksi dengan lebih dari satu jenis *Trypanosoma*. Di Afrika Selatan primer ini mampu mengidentifikasi adanya multiinfeksi beberapa spesies *Trypanosoma* pada kerbau dan sapi (Kajunguri *et al.* 2014) sehingga dapat menekan biaya diagnosis dan memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan primer tunggal untuk satu jenis *Trypanosoma*.



Gambar 2. Pita DNA *T. evansi* dari sampel organ mencit yang diamplifikasi dengan berbagai macam primer. 1: Primer ITS 1 (480 bp); 2: Primer ESAG 6/7 (740 bp); 3: Primer RoTat 1,2 VSG (151 bp) dan 4: Primer TBR1/2 (164 bp); M : Marker, - : kontrol negatif; + : kontrol positif (480 bp). A: otak; B: hati; C: paru; D: jantung; E: limpa; F: ginjal

Hasil yang sama juga dijumpai pada sampel yang diamplifikasi dengan primer ESAG 6/7. Pita DNA terletak pada posisi 740 bp. Primer ESAG 6/7 juga memberikan hasil produk PCR yang bagus yang ditandai dengan adanya visualisasi pita DNA dengan intensitas yang jelas (740 bp) pada seluruh organ yang diuji. Sensitivitas primer ESAG 6/7 dengan fragmen yang lebih pendek (237 bp) diuji oleh Ramírez-Iglesias *et al.* (2017) dan berhasil mengamplifikasi fragmen DNA dari sampel darah rodent dan kerbau-kerbau di Vietnam, termasuk DNA murni *T. evansi*. Namun demikian, Pruvot *et al.* (2010) melaporkan bahwa primer ESAG 6/7 dengan fragmen yang lebih pendek kurang spesifik untuk sapi-sapi perah, khususnya di Thailand. Produk PCR yang dihasilkan menunjukkan adanya sejumlah pita DNA non spesifik yang dapat menyebabkan interpretasi yang salah terhadap sampel yang diuji. Lebih lanjut dijelaskan bahwa primer ESAG 6/7 (237 bp) mempunyai reaksi silang dengan sapi yang terinfeksi *Babesia sp.* Primer ESAG 6/7 pada penelitian ini mengamplifikasi fragmen yang lebih panjang, tetapi belum pernah diuji coba pada sampel di lapang, sehingga belum diperoleh data apakah cukup sensitif untuk mendeteksi *T. evansi* dari sampel sapi potong, sapi perah, kuda, kerbau atau yang lainnya. Sejauh ini, amplifikasi DNA *T. evansi* yang diekstrak dari sampel darah dan organ mencit memberikan hasil yang bagus.

Pita DNA dengan primer RoTat 1,2 VSG terletak pada posisi 151 bp. Fragmen DNA yang diamplifikasi dengan primer RoTat 1,2 VSG pada organ paru terlihat tipis dibandingkan organ yang lainnya. Hasil ini diduga karena beberapa faktor, yaitu kuantitas dan kualitas DNA, proses ekstraksi DNA, jumlah parasitemia pada sampel, dan desain primer yang sesuai Musaya *et al.* 2017; Ramírez-Iglesias *et al.* 2017; Desquesnes, 2013).

Primer Ro Tat 1,2 VSG adalah jenis varian primer yang hanya dimiliki oleh *T. evansi* (Sawitri *et al.* 2015). Primer ini mampu membedakan *T. evansi* dari *T. brucei*. Menurut Devi *et al.* 2018 bahwa dalam keadaan normal seluruh *T. evansi* mengekspresikan gen RoTat 1,2 VSG. Pengujian PCR spesifik untuk *T. evansi* dengan menggunakan Rotat 1.2 VSG memiliki ukuran 151 bp (Boushaki *et al.* 2019). Namun primer ini tidak selalu memberikan hasil yang memuaskan. Salim *et al.* 2011 melaporkan bahwa primer RoTat 1,2 VSG hanya mampu mendeteksi 13 sampel dari 30 sampel darah unta yang mengandung *T. evansi* di Sudan. Hasil yang sama juga diperoleh dari penelitian Devi *et al.* 2018 yang mendapatkan hasil negatif pada beberapa

sampel dari darah kuda gurun di India. Studi lebih lanjut menunjukkan bahwa *T. evansi* yang berasal dari Kenya merupakan kelompok strain tipe B, sedangkan primer RoTat 1,2 VSG hanya mampu mengamplifikasi fragmen DNA dari kelompok strain tipe A (Devi *et al.* 2018). Hasil penelitian pada studi ini juga menunjukkan bahwa sampel organ paru mencit menghasilkan pita DNA *T. evansi* yang lebih tipis dibandingkan organ-organ lainnya. Diduga produk PCR dengan primer RoTat 1,2 VSG akan menampilkan pita DNA dengan intensitas yang lebih baik apabila jumlah *T. evansi* dalam sampel tinggi.

Amplifikasi dengan primer TBR 1/2 menghasilkan pita DNA lebih dari satu (ekstra pita). Adanya ekstra pita DNA dengan primer ini bervariasi tergantung dari sampel yang diuji. Namun, apabila dalam sampel yang diuji terdapat fragmen DNA yang terletak pada posisi 164 bp maka dapat dipastikan bahwa sampel tersebut positif *T. evansi*. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Ramírez-Iglesias *et al.* (2017) dan Ashour *et al.* (2013). Keadaan ini diduga karena adanya *tandem repeat nature* dari target DNA (Ramírez-Iglesias *et al.* 2017). Lebih lanjut dijelaskan oleh Ashour *et al.* (2013) bahwa adanya multi pita DNA pada primer TBR1/2 diduga karena adanya koamplifikasi sebagai akibat dari penempelan primer dalam daerah yang berulang (*repeated regions*) pada genom DNA Trypanosoma. Keadaan ini juga dapat diakibatkan karena jumlah cetakan DNA yang melimpah (Behour *et al.* 2019). Disamping mampu mendeteksi *T. evansi*, primer ini juga dapat mengamplifikasi DNA *T. brucei* dengan ukuran pita DNA lebih pendek dari 164 bp (Ashour *et al.* 2013). Namun menurut Ramírez-Iglesias *et al.* (2017) bahwa primer TBR1/2 tidak menyebabkan reaksi silang dengan *T. vivax* dan mampu mendeteksi *T. evansi* dari inang yang berbeda-beda di daerah Venezuela.

Hasil ini membuktikan bahwa primer-primer yang diuji sesuai untuk diaplikasikan pada sampel organ hewan yang mengandung *T. evansi*. Meskipun semua pita DNA yang teramplifikasi dengan baik, tetapi jika dibandingkan dengan tampilan gambar, kemudahan dalam mendeteksi dan konsistensi hasil menunjukkan bahwa primer ITS 1 dan ESAG 6/7 memberikan tampilan yang jelas. Ashour *et al.* (2013) menyebutkan bahwa perbedaan intensitas pita DNA dapat dipengaruhi oleh jumlah infeksi *T. evansi* dalam sampel organ. Hasil amplifikasi dari organ-organ akan memberikan hasil pita DNA dengan intensitas yang baik apabila jumlah parasit

didalam organ cukup untuk diamplifikasi hariannya.

4. Kesimpulan

Primer yang digunakan dalam penelitian ini (ITS1, ESAG 6/7, RoTat 1.2 VSG, dan TBR1/2) mampu mendeteksi *T evansi* pada semua organ mencit yang diinfeksi *T. evansi*. Untuk kepentingan diagnosis, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sensitivitas primer terhadap sampel organ yang diuji pada berbagai rentang waktu pasca diinfeksi.

Daftar Pustaka

- Adrian SM, Rehana AS, Hassan L, and Wong MT. 2010. Outbreaks of trypanosomiasis and the seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in a deer breeding centre in Perak, Malaysia. *Trop. Anim. Health. Product.* 42 (2): 145-150.
- Ahmed HA, MacLeod ET, Hide G, Welburn SC, Picozzi K. 2011. The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasit Vectors.* 4(68):1-7.
- Ahmed HA, Picozzi K, Welburn SC, Macleod ET. 2013. A comparative evaluation of PCR- based methods for species-specific determination of African animal trypanosomes in Ugandan cattle. *Parasit Vectors.* 6: 316. Published online Nov 1, 2013.
- Anderson NE, Mubanga J, Fevre EM, Picozzi K, Eisler MC, Thomas R, Welburn SC. 2011. Characterisation of the Wildlife Reservoir Community for Human and Animal Trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6):e1211.
- Ashour AA, El-Naga TRA, Barghash SM, Salama MS. 2013. *Trypanosoma evansi*: Detection *Trypanosoma evansi* DNA in naturally and experimentally infected animals using TBR1 and TBR2 primers. *Experimental Parasitology* 134:109-114.
- Behour, T.S., Aboelhadid, S.K., Mousa, W.M., Amin, A.S. & El-Ashram, S.A., 2019, Molecular diagnosis of acute and chronic infection of *Trypanosoma evansi* in experimental male and female mice. *Onderstepoort J Vet Res* 86(1):1-10.
- Boushaki D, Adel A, Dia ML, Buscher P, Madani H, Brihoum BA, Sadaoui H, Bouayed N, Kechemir N. 2019. Epidemiological investigations on *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the South of Algeria. *Heliyon.* 5(7): e02086
- Dargantes AP. 2010. Epidemiology, control and potential insect vectors of *Trypanosoma evansi* (surra) in village livestock in southern Philippines [Thesis S3]. Australia: Murdoch University.
- Desquesnes M, Dargantes A, Lai DH, Lun ZR, Holzmuller P, Jittapalapong S. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: A review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *Biomed Res Int.* 2013:1-20.
- Devi A, Shanker D, Sudan V, Jaiswal A, Singh A, Chaudhary MK. 2018. Phylogenetic studies on RoTat 1.2 VSG of *Trypanosoma evansi* isolate from semi arid India. *Indian Journal of Animal Sciences* 88 (2):150–152.
- Kajunguri D, Hargrove JW, Ouifki R, Mugisha JY, Coleman PG, Welburn SC. 2014. Modelling the use of insecticide-treated cattle to control tsetse and *Trypanosoma brucei* rhodesiense in a multi-host population. *Bull Math Bio* 76(3):673-696.
- Herrera MEV, Ibarra JAM, Moreno MS, Montiel HLH, Curiel RCM, Calderon NC and Cabrera JAD. 2018. *The Mouse Model as a Tool for Histological, Immunological and Parasitological Studies of Trypanosoma cruzi Infection.* Chapter 4. *IntechOpen*, DOI: 10.5772/intechopen.77168.
- Isobe T, Holmes E, Rudenko G. 2003. The transferrin reseptor genes of *Trypanosoma equiperdum* are less diverse in the transferrin binding site than those of the broad-host range *Trypanosoma brucei*. *J Mol Evol* 56: 377-386
- Kariuki CK, Stijlemans B, and Magez S. 2019. The Trypanosomal Transferrin Receptor of *Trypanosoma Brucei*—A Review. *Trop Med Infect Dis* 4(126):1-18.
- Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC. 1992. Sensitive detection of Trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.* 22: 909-918.
- Musya J, Chisi J, Senga E, Nambala P, Maganga E, Matovu E, and Enyaru J. 2017. Polymerase chain reaction identification of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in wild tsetse flies from

- Nkhotakota Wildlife Reserve, Malawi. *Malawi Med J* 29(1): 5–9.
- Ndungu K, Thungu D, Wamwiri F, Mireji P, Ngae G, Gitonga P, Mulinge J, Auma J, Thuita J. 2019. Route of inoculation influences *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* virulence in Swiss white mice. *PLoS ONE* 14(6): 1-10.
- N'Djetchi MK, Ilboudo H, Koffi M, Kaboré J, Kaboré JW, Kaba D, et al. (2017). The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Côte d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Negl Trop Dis* 11(10): 1-16.
- Njiru ZK, Constantie CC, Guya S, Crowther J, Kiragu JM, Thompson RC, Davilla AM. 2005. The use of ITS 1 rDNA PCR in detecting pathogenic African Trypanosomes. *Parasitol. Res.* 95: 186-192.
- Njiru ZK, Traub R, Ouma JO, Enyaru JC, Matovu JC. 2011. Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J Clin Microbiol* 49(4): 1530–1536.
- Office International des Epizootics [OIE]. 2009. Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals. New York, USA.
- Pruvot M, Kamyngkird K, Desquesnes M, Sarataphan N, Jittapalapong S. 2010. A Comparison of six primers sets for Detection of *Trypanosoma evansi* by polymerase chain reaction in rodents and Thai livestock. *J Vet Parasitology* 171:185-193.
- Ramírez-Iglesias JR, Eleizalde MC, Reyna-Bello A, and Mendoza M. 2017. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *J Parasit Dis* 41(2):450–458.
- Thompson CK, Godfrey SS, and Thompson RCA. 2014. Trypanosomes of Australian mammals: A review. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 3(2):57–66
- Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, and Barros CSL. 2009. Neuropathology of Naturally Occurring *Trypanosoma evansi* Infection of Horses. *Vet Pathol* 46:251-258.
- Sawitri DH, Wardhana AH, Wibowo H, Sadikin M, Ekawasti F. 2015. Molecular Identification Technique of *Trypanosoma evansi* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Indones J Anim Vet Sci.* 20(4): 297-307.
- Sawitri DH and Wardhana AH. 2018. Genetic Variability of ESAG 6/7 Gene Isolat *Trypanosoma evansi*. *JITV* 22 (1):38-50.
- Stadhouders R, Pas SD, Anber J, Voermans J, Mes THM, and Schutten M. 2010. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *J Mol Diagn* 12(1):109–117.
- Symula RE, Beadell JS, Sistrof M, Agbebakun K, Balmer O, Gibson W, Aksoy S, and Caccone A. 2012. *Trypanosoma brucei gambiense* Group 1 Is Distinguished by a Unique Amino Acid Substitution in the HpHb Receptor Implicated in Human Serum Resistance. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7):1-6.
- Wuryastuti H, Wasito R, Putro PP. 2016. Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus from Blood Samples Collected Using Flinders Technology Associate testm Cards. *J Vet* 17(2):176-182.