

République Algérienne Démocratique  
et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur  
et la Recherche Scientifique  
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
المدرسة الوطنية العليا للبيطرة



## THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es-Sciences  
En Sciences Vétérinaires

### Thème :

**Epidémiologie de *Trypanosoma evansi* chez  
diverses espèces de mammifères au Sud de  
l'Algérie**

Présentée par : BENFODIL Karima

	Nom & Prénom	Grade	Etablissement
<b>Directrice de thèse</b>	Ait-Oudhia. Kh	Pr	ENSV
<b>Président</b>	Harhoura. K	Pr	ENSV
<b>Examinatrice</b>	Aissi. M	Pr	ENSV
<b>Examineur</b>	Mamache. B	Pr	ISV/Batna
<b>Examineur</b>	Laatamna. A	MCA	UNIV/Djelfa
<b>Examinatrice</b>	Righi. S	MCA	ISV/Taref

Date de soutenance : 24/09/2020

## Tables des matières

Remerciements .....	
Dédicaces.....	
Liste des abréviations .....	
Liste des figures.....	
Liste des annexes .....	
Résumé .....	
Abstract.....	
ملخص .....	
Introduction .....	1
2. Morphologie: .....	6
3. Génome des trypanosomes .....	8
3. Cycle de reproduction.....	9
4. La variation antigénique .....	11
5. Interactions entre le trypanosome et l'hôte mammifère.....	12
6. Pathogénie.....	15
7. Épidémiologie et importance économique de l'infection à <i>T. evansi</i> .....	17
8. Diagnostic de l'infection à <i>T. evansi</i> .....	21
8.1. Diagnostic clinique .....	22
8.2. Diagnostic de laboratoire.....	27
8.2.2 Tests sérologiques de détection d'antigène.....	29
8.2.3 Tests sérologiques de détection d'anticorps.....	29
8.2.4 Diagnostic moléculaire .....	32
9. Moyens de lutte .....	34
9.1 La chimiothérapie .....	34
9.2 La lutte contre le vecteur .....	36
9.3 Prévention de l'introduction dans les zones indemnes .....	36
Chapitre 2 : Plan de travail et objectifs .....	37
1. Avant-propos .....	37
2. Objectif général .....	38
3. Objectifs spécifiques .....	38
4. Plan d'étude .....	39

Chapitre 3: Prevalence of <i>Trypanosoma evansi</i> in horses ( <i>Equus caballus</i> ) and donkeys ( <i>Equus asinus</i> ) in El-Bayadh district, southwestern Algeria. ....	44
Chapitre 4: Assessment of <i>Trypanosoma evansi</i> prevalence and associated risk factors by immune trypanolysis test in camels from Ghardaïa district, South Algeria. ....	45
Chapitre 5: Comparison of serological and molecular tests for detection of <i>Trypanosoma evansi</i> in domestic animals from Ghardaïa district, South Algeria ....	46
Chapitre 6 : Discussion Générale et Conclusion .....	47
1. Epidémiologie de <i>Trypanosoma evansi</i> : prévalence et facteurs de risque .....	48
1.1 Prévalence.....	48
1.2 Analyse des facteurs de risques .....	50
2. Diagnostic de <i>Trypanosoma evansi</i> : évaluation et comparaison entre les techniques sérologiques et moléculaires.....	53
2.1 Comparaison entre les tests sérologiques : .....	54
2.2 Comparaison entre les tests moléculaires.....	55
2.3 Comparaison entre les tests sérologiques et moléculaires.....	55
Conclusions générales et recommandations .....	57
Références Bibliographiques.....	57
Références: .....	58
Annexes .....	82

## *Remerciements*

*Je remercie le Bon DIEU tout puissant de m'avoir donné la force et la volonté de continuer mes études,*

*Je tiens à remercier ma promotrice Professeure AIT- OUDHIA Khatima, pour avoir pris la responsabilité de diriger mon travail et de le mener jusqu'au bout. Pour sa présence, son aide et ses précieux conseils.*

*Je tiens également à exprimer mes remerciements au Professeur BÜSCHER Philippe pour son soutien, ses conseils et son aide.*

*J'exprime mes vifs remerciements aux: Pr. HARHOURA Khaled d'avoir accepté de présider ce jury, Pr. AISSI Meriem, Pr. MAMACHE Bakir, Dr. LAATAMNA Abd Elkarim et Dr. RIGHI Souad pour avoir accepté d'examiner ce travail et pour toute l'attention qu'ils y auront porté.*

*Il m'est agréable d'adresser mes remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers parents,*

*A mon très cher frère,*

*A toute ma famille,*

*A mes amis,*

*A toutes les personnes que j'aime,*

*A toutes les personnes qui m'aiment.*

*Benfodil Karima*

## Liste des abréviations

<b>Ag</b>	Antigène
<b>Apl_1</b>	Apolipoprotéine 1
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>CATT</b>	Test d'agglutination sur carte
<b>EDTA</b>	Éthylène Diamine Tétra-Acide
<b>ELIZA</b>	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
<b>GPI</b>	Glycosylphosphatidylinositol
<b>HAT:</b>	Trypanosomiase Humaine Africaine
<b>IC</b>	Intervalle de confiance
<b>IL</b>	Interleukine
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>Mn</b>	Minute
<b>NO</b>	Oxyde Nitrique
<b>OIE</b>	Organisation Mondiale de la Sante
<b>PCR</b>	Polymérase Chain Reaction
<b>Se</b>	Sensibilité
<b>SN</b>	Système Nerveux
<b>Sp</b>	Spécificité
<b>TNF</b>	Facteur de Nécrose Tumoral
<b>Tr</b>	Tour
<b>VSG</b>	Variant Surface Glycoprotein.

## Liste des figures

Figure 1: Schéma représentatif de la taxonomie des trypanosomes.....	4
Figure 2: Scénario évolutif de <i>T. evansi</i> et <i>T. equiperdum</i> depuis <i>T. brucei</i> .....	6
Figure 3: Mise en évidence de <i>Trypanosoma evansi</i> , frottis sanguin de souris infectées expérimentalement, coloré au MGG .....	7
Figure 4: Division d'un trypanosome .....	10
Figure 5: Représentation du concept de variation antigénique lors d'une infection à <i>T. brucei</i> chez les mammifères .....	12
Figure 6: Evolution des pics d'hyperthermie au cours d'une trypanosomose .....	16
Figure 7: Répartition mondiale de <i>Trypanosoma evansi</i> basée sur 272 études publiées entre 1906 et 2017 .....	18
Figure 8: Morphologie générale et détail des antennes de trois important genres : Haematopota (à gauche), Tabanus (au centre) et Chrysops (à droite).....	21
Figure 9: Etat générale d'une femelle atteinte de <i>T. evansi</i> .....	23
Figure 10: Evolution chronique et aigüe du surra chez les chevaux. . .....	24
Figure 11: Evolution chronique du surra chez des bovins de race locale en Thailand .....	25
Figure 12 : Kératite bleue purulente bilatérale chez un chien, avec surra .....	26
Figure 13: Activités sur le terrain: Contention, enregistrement des données sur les animaux, collecte d'échantillons de sang.....	41

## Liste des annexes

Annexe I : Protocol de CATT/*T. evansi*

Annexe II : Manuel du thermo-cycler

Annexe III : fiche d'enquête

## Résumé

Une étude épidémiologique de type transversal a été menée entre Mars 2016 et Février 2018 au Sud de l'Algérie. Les objectifs de notre étude sont : 1. évaluer la prévalence de *Trypanosoma evansi* chez plusieurs espèces de mammifères, 2. identifier les facteurs de risques associés à *T. evansi*, 3. Comparer les méthodes sérologiques et moléculaires utilisées dans le diagnostic du surra. L'enquête a été menée sur 931 mammifères domestiques : 161 dromadaires, 270 chevaux, 29 ânes, 127 bovins, 168 ovins, 129 caprins, et 76 chiens dans le Sud de l'Algérie. Deux tests de diagnostic moléculaire ont été réalisés, une PCR conventionnelle ciblant le gène ITS 1 et une PCR quantitative ciblant le gène 18 S. Les tests sérologiques effectués sont : le test d'immuno-trypanolyse (TL), l'ELISA/RotaT 1.2, l'ELISA/WCL et le CATT/*T.evansi*. Dans la wilaya de Ghardaïa, les séroprévalences globales observées sur 754 animaux domestiques (161 dromadaires, 93 chevaux, 129 caprins, 168 ovins, 127 bovins et 76 chiens) sont comme suit: 3.1% avec CATT/*T.evansi*, 4.9% avec ELISA/RoTat 1.2, 3.4% avec ELISA/whole lysate et 2.0% avec la TL. Les analyses moléculaires sur ces échantillons ont révélé que 1.7% sont positifs avec qPCR 18S et 1.3% avec PCR ITS1. Sur les 206 équidés de la wilaya d'El-Bayadh (177 chevaux et 29 ânes), les résultats du CATT/*T. evansi* montrent que sur 177 chevaux testés, 80 étaient séropositifs pour *T. evansi* (45,2%) et sur 29 ânes testés, 18 étaient séropositifs (62,1%). Les facteurs de risques identifiés chez les chevaux sont : la végétation dense, les pointes d'eaux et la promiscuité avec les dromadaires. L'analyse uni-variée et la régression logistique multi-variée ont révélés des facteurs de risques associés à *T. evansi* chez les dromadaires : Les dromadaires vivants dans des troupeaux de petite taille (< 50) sont plus affectés que les animaux vivants dans de grands cheptels ( $\geq 50$ ) ( $P = 0.013$ , OR = 8.22, CI95% = 1.64-49.75). En ce qui concerne l'activité des dromadaires, les animaux de courses sont plus affectés que les animaux destinés à la production ( $P = 0.003$ , OR = 0.01, CI95 % = 0.001-0.18). Les animaux présentant des signes cliniques évoquant la trypanosomose ont été plus affectés que les animaux qui n'ont pas de symptômes ( $P = 0.002$ , OR = 21.91, CI95% = 3.48-169.80). Le test Cohen Kappa a démontré une concordance qui varie de faible à parfaite ( $K=0.2-0.8$ ) entre les tests sérologiques. Néanmoins, une forte concordance a été révélée entre les tests moléculaires ( $k=0.868$ ). L'approche des classes latentes a rapporté une sensibilité de 100% pour tous les tests sérologiques et 47% pour les tests moléculaires. Une excellente spécificité a été démontrée pour tous les tests de diagnostic ( $\geq 97\%$ ). En conclusion, Le control du surra en Algérie doit être fait en associant des tests sérologiques et moléculaires. Des mesures sanitaires doivent être prises pour limiter la propagation de la maladie en tenant compte des facteurs de risque associés à la maladie.

**Mots clés :** *T. evansi*, Prévalence, sensibilité, spécificité, diagnostic, facteurs de risques, mammifères domestiques, Algérie.

## Abstract

A cross-sectional study was conducted from March 2016 to February 2018, southern Algeria. The aims of the study were: 1- assessment of *T. evansi* prevalence in several mammals' species. 2- identification of associated risk factors to *T. evansi*. 3- comparison between serological and molecular diagnosis tests for detection of surra. The survey was conducted on 931 domestic mammals: 161 dromedaries, 270 horses, 29 donkeys, 127 bovine, 128 sheep, 129 goats and 76 dogs from south Algeria. Two molecular tests were realized: a conventional PCR targeting the ITS 1 gene and a quantitative PCR targeting the 18 S gene. Serological tests were: immune trypanolysis tests, ELISA/RotaT 1.2, ELISA/WCL and CATT/*T.evansi*. Among 206 healthy equines (177 horses and 29 donkeys) from El-Bayadh district, the results show that out of 177 tested horses, 80 were seropositive to *T. evansi*, 45.2% and out of 29 tested donkeys, 18 were seropositive to *T. evansi*, 62.1% using CATT/*T.evansi*. Among 754 domestic animals (161 dromedary camels, 93 horses, 129 goats, 168 sheep, 127 bovines and 76 dogs) from Ghardaïa district: Overall positivity rates observed with the serological tests were as follows: 3.1% with CATT/*T.evansi*, 4.9% with ELISA/RoTat 1.2, 3.4% with ELISA/whole lysate and 2.0% with immune trypanolysis (TL). Among the 754 samples tested with the molecular tests, 1.7% were positive with 18S qPCR and 1.3% with ITS1 TD PCR. Cohen's Kappa test showed agreement ranging from fair to substantial ( $k=0.2-0.8$ ) between serological diagnostic tests. However, it showed a perfect agreement ( $k=0.868$ ) between molecular diagnostic tests. Latent class analysis showed that all serological tests were 100% sensitive, in contrast to the molecular tests with 47% sensitivity. All tests, though, were highly specific ( $\geq 97\%$ ). Analysis of possible associated risk factors on equines from El-Bayadh district showed that environmental factors that are favorable for Tabanids, such as water and vegetation, but also promiscuity with dromedaries were positively associated with the seroprevalence rate in the horses. Univariate and multi logistic analysis showed risk factors associated to *T. evansi* in dromedaries. The results reported that risk factors were small herd size ( $P = 0.013$ , OR = 8.22, CI95% = 1.64-49.75), the presence of a history of symptoms ( $P= 0.002$ , OR = 21.91, CI95% = 3.48-169.80).and racing activities ( $P = 0.003$ , OR = 0.01, CI95 % = 0.001-0.18). In conclusion, this study showed that the control of surra in Algeria could be based on a combination of screening for *T. evansi*-specific antibodies and molecular tests. Sanitary measures must be taken to limit the spread of the disease to non-endemic areas, taking into account the risk factors associated with the disease.

**Keywords:** *T. evansi*, Prevalence, sensitivity, specificity, diagnosis, risk factors, domestic mammals, Algeria

## ملخص

أجريت دراسة وبائية مستعرضة بين مارس 2016 وفبراير 2018 في جنوب الجزائر. تهدف دراستنا الى:

1. تقييم مدى انتشار متقبية إيفانسي في العديد من أنواع الثدييات، 2. تحديد عوامل الخطر المرتبطة بمتقبية إيفانسي، 3. مقارنة بين الطرق المصلية والجزئية المستخدمة في تشخيص الحالات المرضية. تم إجراء المسح على 931 من الثدييات الاليفة: 161 جمل، و 270 حصاناً، و 29 حصاناً، و 127 من الأبقار، و 168 من الأغنام، و 129 من الماعز، و 76 من الكلاب في جنوب الجزائر. تم إنشاء ورقة فنية لكل عينة من الحيوانات تحتوي على معلومات عن الخصائص الفيزيائية (الجنس، العمر، السلالة، طريقة التربية، نوع المسكن)، الخصائص البيئية (وجود نقاط المياه، وجود النباتات) والحالة الصحية (تاريخ الإجهاض ووجود اعراض المرض والتطعيم والتخلص من الديدان). تم إجراء فحص لكل حيوان بهدف البحث عن أعراض محتملة مرتبطة بداء المتقبيات (فقر الدم، الصافرة، فقدان الوزن والعلامات العصبية). تم إجراء نوعين من الاختبارات التشخيصية الجزئية، PCR ITS-1 و PCR-18S. الاختبارات المصلية التي تم إجراؤها هي: اختبار المناعية، ELISA / RotaT 1.2 ، ELISA / WCL ، CATT / T.evansi و ELISA / RoTat 1.2. الانتشار العام الملاحظ هو كما يلي: 3.1% مع CATT / T.evansi، 4.9% مع ELISA / RoTat 1.2، 3.4% مع ELISA / lysate الكامل و 2.0% مع انحلال المتقبيات المناعي (TL). من بين 754 عينة تم اختبارها بواسطة التقنيات الجزئية، كانت 1.7% إيجابية مع PCR 18S و 1.3% مع PCR ITS1. أظهر اختبار كوهين كبا اتفاقاً متنوعاً من منخفض إلى مثالي ( $K = 0.2-0.8$ ) بين الاختبارات المصلية. ومع ذلك، تم الكشف عن اتفاق قوي بين الاختبارات الجزئية ( $K = 0.868$ ). أفاد نهج الفصل الكامن حساسية 100% لجميع الاختبارات المصلية و 47% للاختبارات الجزئية. وقد تم تحديد خصوصية ممتازة لجميع الاختبارات التشخيصية ( $\leq 97\%$ ). كشف التحليل الأحادي المتغير والانحدار اللوجستي متعدد المتغيرات عن عوامل الخطر المصاحبة لـ *T. evansi* عند الجمال: الجمال الذين يعيشون في قطعان بحجم  $\geq 50$  أكثر تأثراً من الحيوانات التي تعيش في قطعان كبيرة ( $P = 0.013$ ,  $OR = 8.22$ ,  $CI95\% = 1.64-49.75$ ). فيما يتعلق بنشاط الجمل، فإن الحيوانات المستخدمة في السباق هي أكثر تأثراً من الحيوانات المعدة للإنتاج ( $P = 0.002$ ,  $OR = 21.91$ ,  $CI95\% = 3.48-169.80$ ). عوامل الخطر التي تم تحديدها في الخيول هي: النباتات الكثيفة، نقاط المياه والاختلاط مع الجمال. في الختام، يجب أن يتم التحكم في مرض *T. evansi* في الجزائر من خلال الجمع بين الاختبارات المصلية والجزئية. يجب أن يكون التشخيص أقرب ما يمكن إلى بؤر انتشار المرض. الاختبار الميداني المناسب الوحيد هو CATT / *T. evansi* الذي يجب أن يكون أداة تشخيص روتينية يقدمها البيطريون الممارسون. ثانياً، يجب إخضاع الحالات المصابة بفيروس نقص المناعة البشرية للاختبارات الجزئية مثل PCR 18S أو PCR ITS1 لتأكيد المرض. يجب معالجة الحيوانات المريضة المؤكدة على الفور. يجب اتخاذ تدابير صحية للحد من انتشار المرض في المناطق غير الموبوءة، مع مراعاة عوامل الخطر المرتبطة بالمرض. يجب أن يؤخذ دور الخزانات في الاعتبار في برامج مراقبة السرة.

الكلمات المفتاحية: متقبية إيفانسي، الانتشار، الحساسية، الخصوصية، التشخيص، عوامل الخطر، الثدييات الاليفة، الجزائر

## Introduction

*Trypanosoma evansi* est un protozoaire flagellé, extra cellulaire du sang. Le premier trypanosome pathogène, il a été mis en évidence en 1880 chez des chevaux et des dromadaires en Inde par Griffith Evans dont il tient son nom (Hoare, 1972). Ce parasite affecte de nombreuses espèces animales: camelins, bovins, petits ruminants, chiens et équidés (Fernández et al., 2009). *Trypanosoma evansi* est de distribution géographique mondiale, il est présent dans tous les pays où les dromadaires sévissent.

La propagation de la maladie est de plus en plus importante, en passant par le Maroc, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, l'Égypte, le Soudan et l'Éthiopie, mais également le moyen orient et le Sud Est asiatique (Aregawi et al., 2019). *Trypanosoma evansi* est essentiellement transmis par des vecteurs mécaniques de la famille des Tabanidés (*Tabanus* spp., *Chrysops* spp. et *Hematopota* spp ) et des Stomoxes. La transmission par les chauves-souris vampires (*Desmodus rotundus*) a été rapporté en Amérique du Sud (Herrera et al., 2004).

Les animaux atteints par *T. evansi* présentent un amaigrissement chronique, des ictères, des œdèmes, de l'anémie, des avortements et des troubles neurologiques (Brun et al., 1998; Desquesnes et al., 2013b). Une apparition brutale et un taux de mortalité élevé ont été également décrits. Chez les équidés, le parasite peut franchir la barrière hémato-céphalique provoquant l'ataxie, l'hyperexcitabilité ; la cécité et l'apparition progressive d'une paralysie de l'arrière-train (Kumar et al., 2013).

Les signes cliniques sont à titre indicatif du Surra. Le diagnostic de certitude ne peut être confirmé que par des examens de laboratoire. Des examens parasitologiques sont généralement effectués par observation microscopique d'une goutte de sang étalée sur une lame ou de liquide céphalo-rachidien (dans le cas des signes nerveux) (Desquesnes et al., 2013a). Cependant, dans le cas de la trypanosomose, les tests sérologiques sont très utiles voire indispensables. Les techniques sérologiques actuellement utilisées et répertoriées dans le Manuel terrestre de l'Organisation Internationale des Epizooties (OIE) de 2008 sont les tests ELISA et le test d'agglutination sur carte (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis *T.evansi* ou CATT/*T .evansi*). Chez l'homme, des cas de trypanosomoses à *Trypanosoma evansi* ont été décrits dans différents pays enzootique. La transmission à l'homme peut se faire suite à un contact direct avec un animal infecté ou avec de la viande contaminée (Van Vinh Chau et al.,

2016). Il est important de signaler que le surra est classé parmi les vingt maladies ayant le plus grand impact sur les populations pauvres (Perry et al., 2002). Concernant l'Afrique aucun travail de quantification n'a été réellement réalisé pour l'instant (Mochabo et al., 2006).

En Algérie, la trypanosomose est une maladie légalement réputée contagieuse au titre de l'article 2 du décret exécutif n° 95-66 du 22 Ramadhan 1415 correspondant au 22 février 1995, fixant la liste des maladies animales à déclaration obligatoire et les mesures générales qui leur sont applicables. Depuis 2008 *T. evansi* est inscrit sur la liste des maladies à déclaration obligatoire de l'OIE quelle que soit l'espèce infectée.

Le statut de la trypanosomose à *Trypanosoma evansi* est mal connu, peu d'études ont été réalisées sur l'épidémiologie de *Trypanosoma evansi* en Afrique où la trypanosomose sévit à l'état hyper-enzootique. Les seules études publiées jusqu'à présents en Algérie ont été faites chez les dromadaires (Bennoune et al., 2013; Boushaki et al., 2019) et aucune étude n'a été réalisée chez les équidés, les ruminants et les chiens, probables réservoirs de la trypanosomose à *Trypanosoma evansi* en Algérie.

Cette Hypothèse nous a semblé intéressante à explorer pour plusieurs raisons : (i) la circulation relativement anarchique des animaux dans notre pays, (ii) leur déplacement non contrôlé notamment pour la reproduction et le loisir, (iii) la présence des porteurs chroniques, véritables réservoirs du parasite, dont la prévalence est totalement ignorée. Ces faits aggravent la situation épidémiologique de ladite pathologie et nous emmènent à nous poser un certains nombres de questions, telles que : (i) le surra est-il endémique en Algérie ? (ii) les ruminants et les chiens peuvent-ils être considérés comme porteurs chroniques voire réservoirs du parasite ? *Trypanosoma evansi* peut-il être à l'origine des troubles nerveux et de reproduction dans les élevages de chevaux ?

Les objectifs de notre étude sont :

1. Apporter une contribution à la connaissance de la prévalence de *Trypanosoma evansi* chez les dromadaires, les chevaux, les ruminants et les chiens dans le Sud de l'Algérie.
2. Etudier quelques facteurs de risques tels que la présence de conditions environnementales favorable à la prolifération des vecteurs mécaniques, le système d'élevage et les caractéristiques physiques des animaux.

3. Faire une comparaison entre plusieurs tests sérologiques de diagnostic de *T. evansi*.
4. Faire une comparaison entre plusieurs tests moléculaires de diagnostic de *T. evansi*.
5. Faire une comparaison entre les tests sérologiques et moléculaires pour diagnostic de *T. evansi*.

# **Chapitre 1 : Revue de la littérature**

## Chapitre 1 : Revue de la littérature

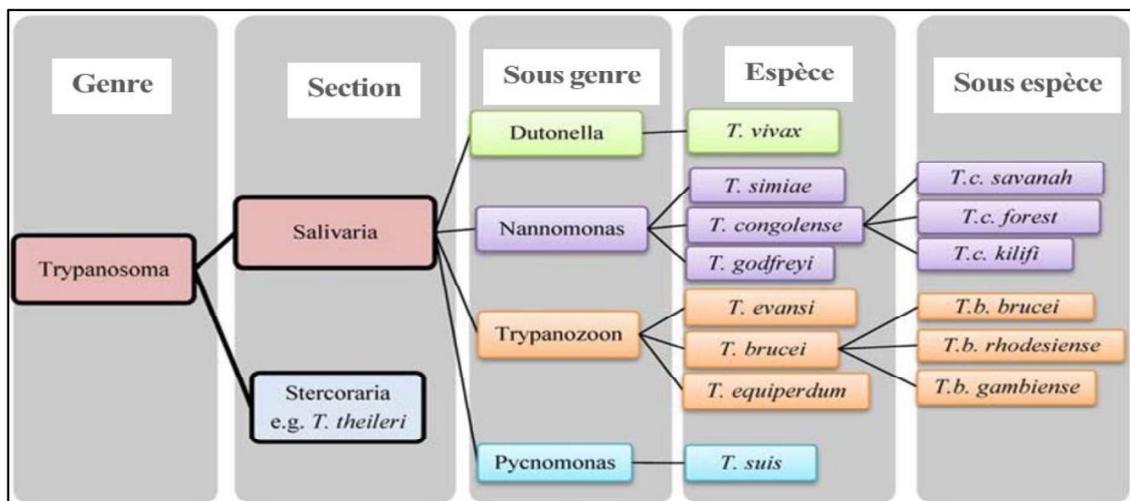
### 1-Taxinémie

*Trypanosoma evansi* est un eucaryote, unicellulaire, flagellé. Il appartient à l'ordre des Kinetoplastida, famille des Trypanosomatidés, genre *trypanosoma* et sous genre : *trypanozoon* auquel appartiennent aussi *T. brucei* et *T. equiperdum* (Hoare, 1972).

Au sein du genre *Trypanosoma*, deux sections sont décrites, la *Stercoraria* à laquelle appartient le parasite non pathogène des bovins : *T. theileri* et la *Salivaria* à laquelle appartiennent les trypanosomes animales africains. Cette dernière section est subdivisée en sous-genres *Dutonella* avec les espèces *T. vivax*, *Nannomonas* avec *T. congolense*, *T. simiae* et *T. godfreyi*, *Trypanozoon* avec *T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum* et *Pycnomonas* avec *T. suis*. *T. congolense* est subdivisé en sous-espèces: savane, kilifi et forêt.

Les sous espèces de *T. brucei* sont : i- *Trypanosoma brucei brucei* : un des agents de Nagana, trypanosomose du bétail et pour laquelle les animaux sauvages sont des réservoirs. ii-*Trypanosoma brucei gambiense* et *Trypanosoma brucei rodescience* : agents responsables de la trypanosomose humaine africaine (Gibson, 2003).

*Trypanosoma* et *leishmania* partageants la même famille des *Trypanosomatidae* descendent probablement des parasites d'insectes hématophages qui se sont transmis à un hôte vertébrés pendant le repas (Simpson et al., 2006).



**Figure 1:** Schéma représentatif de la taxonomie des trypanosomes (Gibson, 2003; Hoare, 1972).

Dans une hypothèse avancée par Hoare (1972), il a été suggéré que *T.evansi* dérive de *T. brucei* et a perdu une partie de son ADN mitochondrial du kinétoplaste. La transformation procyclique du parasite dans la glossine est devenue impossible (Lai et al., 2008). *T. evansi* reste bloqué au stade trypomastigote et exclusivement à transmission mécanique (Borst et al., 1987; Lai et al., 2008).

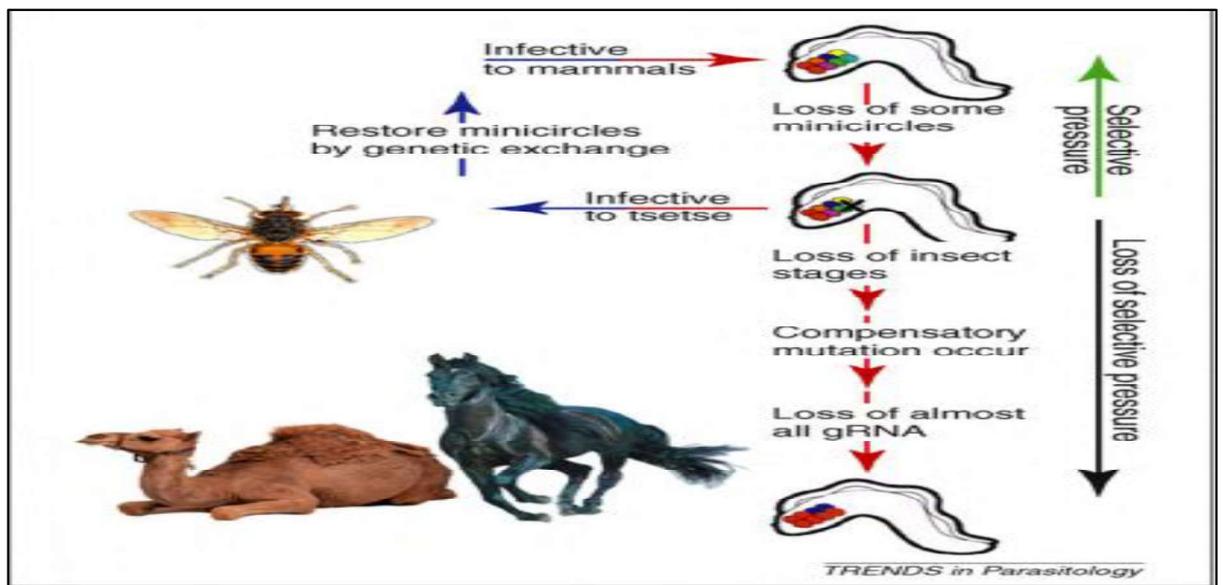
L'hypothèse qui soutient le fait que *T.evansi* dériverait de *T.brucei* suggère que le parasite a perdu sa capacité de développement dans le vecteur biologique après avoir perdu ses caractéristiques polymorphiques pour ne garder qu'une forme longue. Ce phénomène s'est produit suite à plusieurs passages du parasite entre les dromadaires via les insectes piqueurs ce qui a augmenté la virulence de *T.brucei* chez les dromadaires. La transmission par des insectes piqueurs a permis la sélection des parasites les plus aptes à la transmission mécanique, ainsi le trypanosome serait adapté à un nouveau mode de transmission via des vecteurs non habituels dans la transmission de *T. brucei*. Ce qui a conduit à l'émergence de *T. evansi* en dehors de la corne d'Afrique qui est la limite de la distribution géographique des glossines et où *T. brucei* est présent (Hoare, 1972).

D'autres études ont montré l'intérêt de classification de *T. evansi* en se basant sur les caractères génétiques (Foil, 1989). Le sous genre Trypanozoon présente un groupe homogène. Des auteurs ont rapporté qu'il existe une importante homogénéité moléculaire entre les souches (Rm et al., 2002; de Oliveira Lima et al., 2008). Des études d'amplification aléatoire d'ADN ont montré qu'il existerait un fragment d'ADN de *T. evansi* présent chez toutes les souches mais qui était absent chez *T. brucei* (Ventura et al., 2002). Ce fragment indiquerait la présence d'une origine commune renforçant la possibilité d'une émergence de *T. evansi* à partir de *T. brucei* (de Oliveira Lima et al., 2008).

Récemment, Certains auteurs ont évoqué la dérive génétique de *T. evansi* à partir de *T. brucei* plusieurs fois et dans des localisations différentes conduisant à la formation d'un groupe de parasites aux caractères communs. Contrairement à d'autres auteurs qui ont proposé une origine commune aux différentes souches de *T. evansi* après avoir identifié un gène synapomorphique (le gène Te664, révélé par amplification aléatoire d'ADN) et considèrent qu'une émergence continue ne pourrait se faire que dans la zone de répartition de *T. brucei*, ce qui ne correspond pas à la répartition globale de *T. evansi*

actuellement (Antoine-Moussiaux and Desmecht, 2008; Desquesnes et al., 2013b; OIE, 2017).

*T. equiperdum* est très similaire avec *T. evansi*. Il est aussi reconnu pour être un dérivé de *T. brucei* après une perte d'ADN kinetoplastique. Il a été suggéré que *T. evansi* et *T. equiperdum* devrait être renommé : *Trypanosoma brucei evansi* et *Trypanosoma brucei equiperdum* (Wells, 1984). Cette suggestion a été récemment proposée en se basant sur l'idée que ces sous espèces sont des mutations de *T. brucei* par perte du matériel génétique (Lai et al., 2008).



**Figure 2:** Scénario évolutif de *T. evansi* et *T. equiperdum* depuis *T. brucei* (Lun et al., 2010)

Les théories qui s'appuient sur les caractères génétiques négligent la grande importance liée au parasite concernant: sa pathogénicité, les vecteurs, ses hôtes et sa distribution géographique. Dans ce sens, il serait plus raisonnable et moins confus de garder la taxonomie telle qu'elle est en considérant *T. evansi* une espèce à part entière, pour sa grande différence biologique, écologique et médicale de *T. brucei* (Gibson, 2007).

## 2. Morphologie:

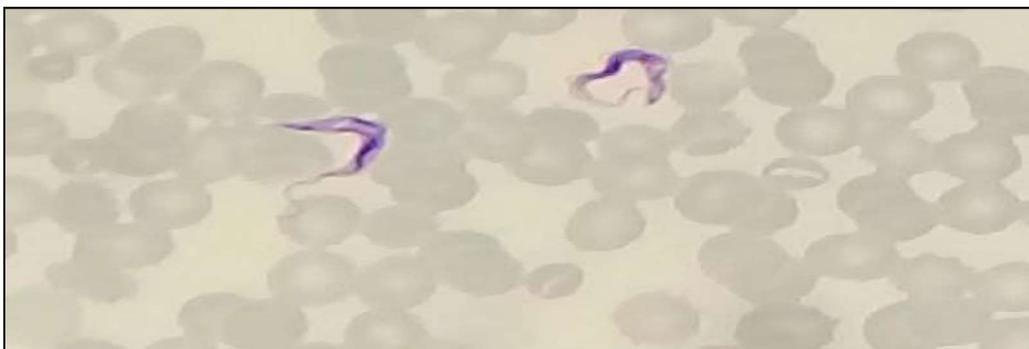
*Trypanosoma evansi* est un parasite unicellulaire, sanguin et tissulaire, extracellulaire, essentiellement monomorphe trypomastigote. *T. evansi* est considéré comme une espèce monomorphe puisqu'il se retrouve quasi-

uniquement sous une forme dite « forme longue » ou « slender » dans le sang de l'hôte et sur les pièces buccales du vecteur. La forme longue du parasite est de  $24 \pm 4 \mu\text{m}$  (minimum  $15 \mu\text{m}$ , maximum  $33 \mu\text{m}$ ). Le kinetoplaste est petit  $0.6 \mu\text{m}$  en position sub-terminale et sub-marginale ou marginale (Hoare, 1972).

Les formes classiquement retrouvées chez *T. brucei* (courtes ou intermédiaires) ont été observées dans de rares cas chez *T. evansi*. Dans du sang frais *T. evansi* présente une forme caractéristique dite « Slender » ou « forme longue » du sous genre trypanozoon: plus petit que *T. theleri* mais plus long que *T. congolense*, avec une extrémité postérieure pointue, un flagelle libre recouvert par une membrane ondulante pouvant former des vagues le long du parasite, et dont la partie libre se prolonge à l'extrémité antérieure très visible ce qui provoque des poches de lumière si le parasite est observé à l'état frais en contraste de phase, des mouvements actifs mais produisent des déplacements limités sous microscope (Desquesnes et al., 2013b).

La taille et la forme sanguine du parasite ne sont pas liées aux caractéristiques génétiques mais plus ou moins avec les conditions de développement du parasite et la réponse immunitaire de l'hôte (Tejero et al., 2008).

Il est important de noter que dans certains cas des formes courtes du parasite sont observées et elles peuvent être confondues avec des espèces identifiées dans le sang tel que *T. vivax* comme il a été observé dans un cas en Espagne (Tamarit et al., 2010), mais *T. evansi* est caractérisé par une forme longue et morphométrique du sous genre *Trypanozoon* avec un polymorphisme très limité (Desquesnes et al., 2013b).



**Figure 3:** Mise en évidence de *Trypanosoma evansi*, frottis sanguin de souris infectées expérimentalement, coloré au MGG (cliché personnel)

### 3. Génome des trypanosomes

Le génome des trypanosomes est constitué d'ADN nucléaire et ADN kinetoplastique (kDNA). L'ADN nucléaire est organisé en chromosomes, ces derniers sont classés en mini-chromosomes, chromosomes intermédiaire ou méga-chromosome. L'ADN localisé dans les mini-chromosomes est répétitif, abondant, satellite, ubiquitaire et hypervariable (Desquesnes and Dávila, 2002).

Le kinetoplaste est l'un des organites du trypanosome, il représente 20 % de l'ADN totale, il est constitué de cercles d'ADN de tailles différentes : environ 50 copies de maxi-cercles (20) kb et 5000-10000 copies de mini-cercles 1(kb). Les maxi cercles jouent le rôle de l'ADN mitochondrial car ils codent les ARN ribosomiaux et les sous unités protéiques des complexes respiratoires. Les mini-cercles codes les ARN guides qui interviennent dans la transcription des protéines des complexes respiratoires (Lun and Desser, 1995; Desquesnes and Dávila, 2002).

Cependant *T. evansi* est caractérisé par une absence de maxi-cercles et une faible hétérogénéité au sein des mini-cercles. Ainsi l'ADN kinetoplastique est la seule différence entre les sous espèces de *T. brucei* ; c'est sur cette diversité de taille et de séquences entre les différentes espèces de trypanosome que se base la création d'amorces utilisées dans le diagnostic par PCR (Masiga et Gibson, 1990 ; Desquesnes et Davila, 2002).

*T. evansi* possède des caractéristiques biochimiques similaires à *T. brucei* mais il est incapable de se développer dans le vecteur, ceci est due à la perte des maxi-cercles de l'ADN kinetoplastique d'où son incapacité à effectuer la phosphorylation oxydative (Hoare, 1972; Borst et al., 1987; Lun and Desser, 1995; Schnauffer et al., 2002; Lai et al., 2008). *T. evansi* et *T. equiperdum* peuvent survivre uniquement sous forme sanguine où l'ATP est produite exclusivement par glycolyse (Helfert et al., 2001; Stephens et al., 2007; Roldán et al., 2011).

En se basant sur le profil enzymatique restrictif des mini-cercles d'ADNk, *T. evansi* a été divisé en type A (identité des séquences à 96%) et type B qui présente une identité > 96% au sein du groupe. Les isolats de type mini cercles A sont les plus abondants dans toute l'aire de répartition de *T. evansi* (Songa et al., 1990; Ou et al., 1991; Lun et al., 1992). En revanche, des mini-cercles de type B n'ont pas été détectés que dans quelques

isolats de *T. evansi* provenant de dromadaires du Kenya (Borst et al., 1987; Ngaira et al., 2004).

Certains *T. evansi* d’Amérique du sud et de Chine n’ont ni mini-cercles ni maxi-cercles (dyskynetoplastiques) (Borst et al., 1987; Stevens et al., 1989; Masiga and Gibson, 1990; Songa et al., 1990; Ou et al., 1991; Zr and K, 1991; Ventura et al., 2000; Schnauffer et al., 2002;).

Pour comprendre l’hétérogénéité génétique de *T. evansi*, des études considérables ciblant l’analyse des isoenzymes, le polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), les marqueurs microsatellites et l’ADN polymorphe amplifié ont indiqué que les isolats de *T. evansi* provenant de différentes parties du globe sont génétiquement homogènes (Gibson et al., 1983; Stevens et al., 1989; Songa et al., 1990; Ventura et al., 2002).

*T. evansi* type A existait en tant que lignée clonale unique (Gibson et al., 1983; Boid, 1988; Njiru et al., 2007). Cette faible hétérogénéité est en partie attribuée à l’utilisation des techniques à faible résolution et à l’absence de recombinaison provoquée par le fait que l’échange génétique dans les trypanosomes ne se produit que lors de leur développement chez la mouche tsé-tsé ce qui n’est pas le cas pour *T. evansi* (Jenni et al., 1986; Njiru et al., 2007). En revanche, en raison du pléotropisme étendu de l’hôte dans diverses régions géographiques, de l’hétérogénéité de la virulence et de la pathogénèse, une variabilité génétique importante est à prévoir (Queiroz et al., 2000; Reid, 2002; de Menezes et al., 2004).

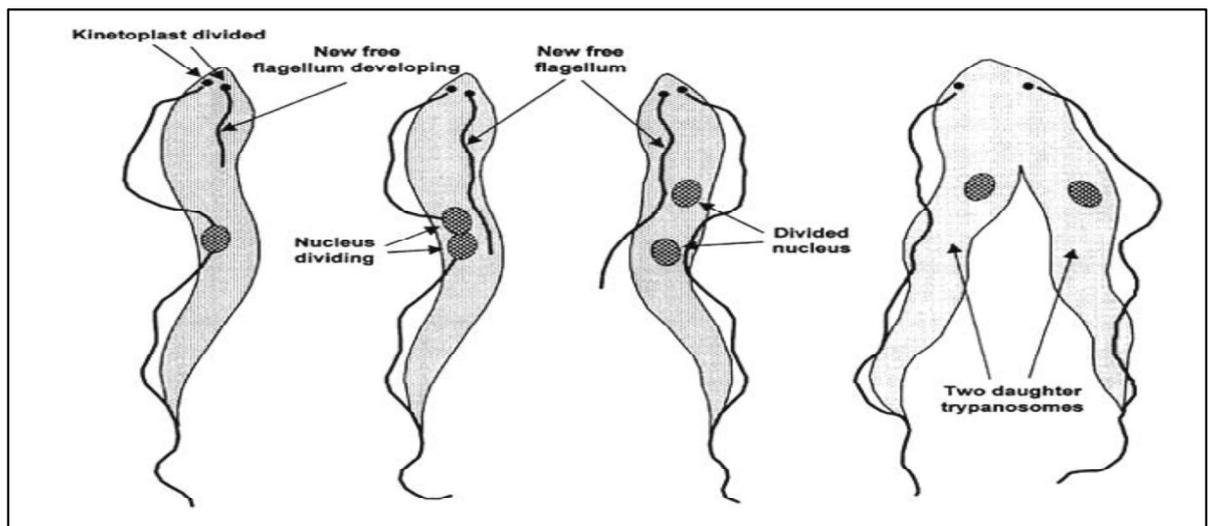
Des études récentes par RFLP, des répétitions de séquences inter-simples (ISSR), des microsatellites et une analyse des régions ITS ont indiqué que *T. evansi* type B est génétiquement différent de *T. evansi* type A (Masiga et al., 2006; Njiru et al., 2007; Amer et al., 2011).

### **3. Cycle de reproduction**

Suite à des mutations génétiques, *T. evansi* n’ a pas la capacité de se développer dans la glossine (cf. chapitre 1. 2). Il reste sous sa forme proliférative (forme longue) chez l’hôte et même lors de son passage sur les pièces buccales d’un arthropode. Le parasite se multiplie de manière clonale par division cellulaires successives. La reproduction sexuée est considérée improbable. Aucun stade de développement chez le vecteur

mécanique n'a été démontré, par conséquent la forme procyclique « epimastigote » n'existe pas chez *T.evansi* ce qui est due à l'absence de maxi- cercles d'ADN kinetoplastique (Osir et al., 1999).

Il était alors envisagé que la cellule mère se divisait en commençant par le flagelle puis le kinetoplaste et enfin le noyau pour donner naissance à deux cellules filles identiques (figure 4). La réplication de *T. evansi* se produit par fission binaire et longitudinale du flagelle et du Kinetoplaste (Liu-liu *et al.*, 2005).



**Figure 4:** Division d'un trypanosome

(<http://www.fao.org/docrep/006/X0413E/X0413E02.gif>)

Les trypanosomes se nourrissent par pinocytose suite à l'invagination de la membrane au niveau de la poche flagellaire: les vésicules formées sont dirigées vers les lysosomes où s'effectue la digestion des molécules endocytées, le glucose essentiellement (Hoare, 1972). Les parasites sont incapables de synthétiser leur propre cholestérol et acide gras, ils utilisent pour leur croissance des « low density lipoprotein particles »; ces dernières sont internalisées par l'intermédiaire d'un récepteur. Les lipides produits par ces particules entreront dans la composition des membranes (Coppens et al., 1995).

*Trypanosoma evansi* n'effectue pas un cycle chez l'insecte contrairement à la plupart des trypanosomes qui ont un cycle biologique dixène. La forme sanguine du parasite ne présente pas de cycle de Krebs fonctionnel et est dépourvue de cytochrome de la chaîne respiratoire ; l'approvisionnement en ATP se fait par glycolyse contrairement aux trypanosomes qui subissent des cycles biologiques dixène qui utilisent les transporteurs

membranaires (Lun and Desser, 1995). Les trypanosomes sont des parasites permanents du sang et ils tirent leurs ressources directement du milieu où ils se trouvent, ils sont ainsi responsable de la spoliation du glucose dans le milieu sanguin (Hoare, 1972).

#### 4. La variation antigénique

Les VSG sont ancrés à la surface cellulaire par une liaison covalente entre le résidu C-terminal et le glycosylphosphatidylinositol (GPI) dans la membrane cellulaire, avec environ 107 molécules par cellule. Ils forment une monocouche de 12-15 nm sur toute la surface des trypanosomes sanguins et ils sont considérés comme un facteur de virulence essentiel (Vickerman, 1969; Ferguson et al., 1988). Chaque molécule VSG contient un domaine N-terminal et un domaine C-terminal (Johnson and Cross, 1979; Carrington et al., 1991).

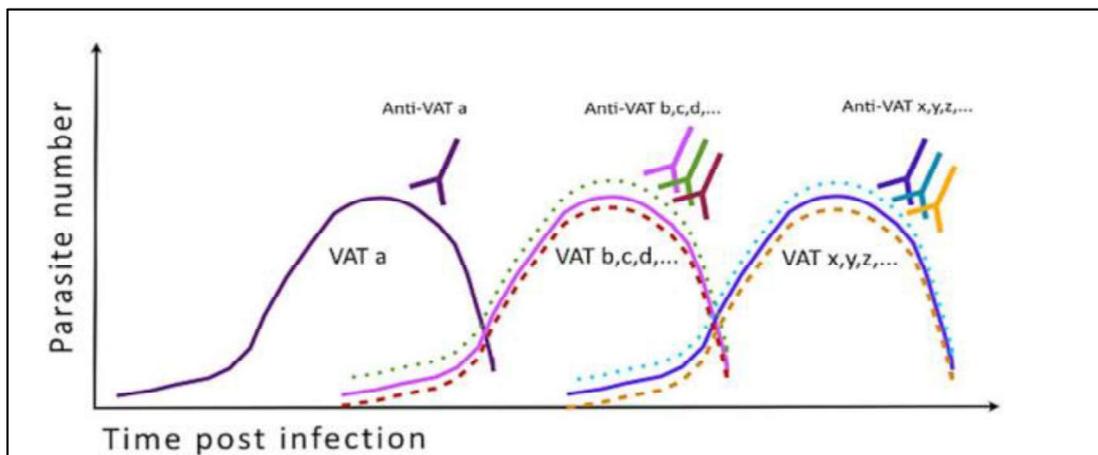
Le domaine N-terminal est exposé à l'environnement extracellulaire et montre une extrême variabilité dans la séquence primaire qui est composée de 350 à 400 résidus. Le domaine C-terminal est relativement plus conservé, il comprend environ 50 à 100 résidus. Il est inaccessible aux anticorps, donc moins impliqué dans la variation antigénique (Miller et al., 1984; Schwede et al., 2011).

Le VSG hautement immunogène détermine le type d'antigène variable (TVA) du trypanosome individuel et déclenche des anticorps protecteurs spécifiques à la TVA avec une activité opsonisante, agglutinante et lytique (Van Meirvenne et al., 1995; Schwede et al., 2011, 2015). RoTat 1.2 est la TVA prédominante de la plupart des souches de *T. evansi* (Songa and Hamers, 1988; Verloo et al., 2001). Pour faire face à la pression immunitaire de l'hôte, les trypanosomes ont développé un système appelé variation antigénique (Vickerman, 1978; Pays et al., 2004; Morrison et al., 2009; Horn, 2014).

La variation antigénique est un changement périodique dans l'expression des VSG, par lequel les parasites expriment et éliminent séquentiellement une série de différents VSG, ce qui leur permet d'échapper aux réponses immunitaires protectrices de l'hôte (Vickerman, 1978). Un seul parasite exprime un seul type de VSG à un moment donné, sauf lors de la variation (Barry et al., 2005). Lors de la première vague ascendante de parasitémie, la majorité des parasites expriment le même VSG ou la TVA principale (Np et al., 1999; Hall et al., 2013). Ensuite, environ 1% des divisions de trypanosomes

produisent une nouvelle TVA en exprimant un VSG différent (Np et al., 1999; Hall et al., 2013).

Ces nouveaux trypanosomes «antigéniquement distincts» se multiplient et remplacent la première TVA, donnant lieu à une vague de parasitémie qui se répète plusieurs fois et entraîne le développement d'une infection chronique (Pays et al., 2001; Baral, 2010; Schwede and Carrington, 2010; Hall et al., 2013). Les vagues de parasitémie chez les hôtes infectés sont le résultat d'une interaction continue entre le système immunitaire et la variation antigénique. De plus, la commutation VSG permet aux parasites d'infecter l'hôte qui a des anticorps contre d'autres variantes précédemment infectantes (Barry et al., 2005). Chaque pic de croissance individuel peut contenir plusieurs variantes distinctes (figure 5) (Cnops et al., 2015).



**Figure 5:** Représentation du concept de variation antigénique lors d'une infection à *T. brucei* chez les mammifères (Cnops et al., 2015).

## 5. Interactions entre le trypanosome et l'hôte mammifère

Contrairement à la trypanosomose due à *T. brucei*, les données sur les aspects immunobiologiques et les mécanismes de contrôle de l'infection à *T. evansi* sont limités (Dn et al., 1998a, 1998b). *T. evansi* transmis mécaniquement achève son cycle de vie complet chez l'hôte mammifère et il est soumis à une pression immunitaire constante (Baral et al., 2007).

L'évolution du parasite a abouti au développement équilibré de systèmes de régulation de la croissance, permettant au parasite de survivre suffisamment longtemps

sans tuer son hôte mammifère, en assurant sa transmission efficace (Stijlemans et al., 2010).

Lors de l'infection par des trypanosomes africains, les deux types de réponses immunitaires spécifiques de l'hôte sont activés : (i) une forte réponse immunitaire cellulaire de type I, constituée de molécules pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF), les interleukines (IL-1, IL-6) et l'oxyde nitrique (NO) produits principalement par des macrophages activés « classiques ». (ii) une forte réponse humorale anti-trypanosome des cellules B (Mansfield and Paulnock, 2005; Magez et al., 2008).

Les trypanosomes morts libèrent l'ADN trypanosomien et le GPI ancré de la VSG responsables de l'activation des macrophages pour la sécrétion des molécules pro-inflammatoires telles que le TNF-, IL-6, IL-1, IL-10 et de NO en tant que première réponse du système immunitaire de l'hôte et qui sont impliquées dans le contrôle du premier pic de la parasitemie par la toxicité du TNF et NO à la fois pour la cellule de l'hôte et le parasite (Stijlemans et al., 2007).

La production de NO dépendant de l'IFN est impliquée dans la suppression de la prolifération des lymphocytes T dans l'infection à *T. evansi* et *T. brucei* (Hertz and Mansfield, 1999). Une réaction inflammatoire a lieu, associée à des taux élevés en protéines inflammatoires (protéine C-réactive, haptoglobine, alpha 2-macroglobuline), concomitante à la production d'immunoglobulines M (IgM) ciblant les glycoprotéines de surface du parasite (Desquesnes et al., 2013b).

Ce processus inflammatoire exacerbé participe également à l'immunodépression qui s'ensuit, des études expérimentales ayant montré que l'inhibition de l'acétylcholinestérase sanguine, un marqueur de l'inflammation associé à ce parasite, permettait une amélioration de la réponse immunitaire contre le trypanosome via les cytokines pro-inflammatoires (Desquesnes et al., 2013b). Cependant, cette suppression n'a eu aucun effet mesurable sur le contrôle de la parasitémie ou sur la durée de vie des souris infectées par *T. evansi* dans des conditions de laboratoire (Baral et al., 2007).

La suppression spectaculaire des réponses immunitaires pourrait entraîner une forte sensibilité aux infections opportunistes (Flynn and Sileghem, 1991; Sileghem et al., 1991; Darji et al., 1992). De plus, il a été démontré que l'immunosuppression due à *T.*

*evansi* provoque un échec de vaccination contre la peste porcine classique et *Pasteurella multocida* (septicémie hémorragique) (Holland et al., 2001, 2003). Les macrophages et les cellules T sont impliqués dans l'initiation de l'immunosuppression (Tabel et al., 2008).

L'immunosuppression causée par les macrophages suppresseurs est caractérisée par une inhibition de la prolifération des lymphocytes T due à une régulation négative de la production d'IL-2 et de l'expression du récepteur de l'IL-2 (Sileghem et al., 1989; Darji et al., 1992).

Cependant, *T. evansi* défait l'immunité humorale par un mécanisme de variation antigénique. Ce mécanisme lui permet de se varier sporadiquement et la principale glycoprotéine de surface (glycoprotéine de surface variable ou VSG) de la membrane conduit à l'échappement à la reconnaissance par les anticorps.

L'augmentation des taux des anticorps IgM et IgG résulte de l'activation des cellules B ou se présentent les récepteurs des IL-6 (Pays et al., 2006). La production des IgM est plus importante que les IgG (Sacks and Askonas, 1980). Des études ont montré que la pénétration d'IgM dans les tissus où les trypanosomes répliquent peut être limitée car c'est une molécule plus volumineuse et que cela peut conduire à des infections chroniques, en raison de la présence des réservoirs dans les tissus tout en évitant une croissance incontrôlée du parasite dans la circulation sanguine (Sacks and Askonas, 1980).

Les IgG sont détectable seulement après remise de la parasitémie contrairement aux IgM qui sont présents en phase de parasitémie (Aquino et al., 1999). Bien que les réponses IgM et IgG aux VSG se produisent lors de l'infection, l'élimination de la TVA (type antigénique variable majeur) infectant est liée à une réponse d'IgM. Les anticorps dirigés contre les épitopes spécifiques de surface de la couche de VSG vont opsoniser les parasites et les complexes immuns qui seront efficacement phagocytés et détruits, principalement dans le foie, par les macrophages (Desquesnes et al., 2013b).

Le rôle du complément dans la lyse du parasite a été proposé, le contrôle des souris infectées par *T. evansi* avec un complément (C5) déficients ont montré des ondes de parasitémie successives aussi efficacement que les souches de souris avec un complément compétent (Vincendeau and Bouteille, 2006).

La trypanotolérance est la capacité relative de certaines races de bétail à survivre, à se reproduire et à rester productives sous le défi de la trypanosomose sans l'aide de médicaments trypanocides. Les bovins trypanotolérants comme le N'Dama, la taurine à cornes courtes Baoulé et Lagune contrôlent le développement des parasites et limitent leurs effets pathologiques, dont le plus important est l'anémie (Murray and Dexter, 1988).

La trypanotolérance est sous contrôle génétique, mais sa stabilité peut être affectée par des facteurs environnementaux, tels que les maladies intercurrentes, la gestation, la mise bas, l'allaitement, la lactation et la malnutrition (Berthier et al., 2015). La capacité des bovins trypanotolérants à générer des réponses d'anticorps durables aux antigènes trypanosomiens est probablement la caractéristique immunologique la plus importante qui a été identifiée jusqu'à présent.

Après l'infection, les animaux développent une réponse IgM spécifique aux trypanosomes qui est similaire chez les bovins trypanotolérants et trypanosensibles (Authié et al., 1993). Une population distincte d'IgM est constituée d'anticorps de faible spécificité, qui réagissent à la fois avec les antigènes trypanosomes et non-trypanosomes. Ces anticorps poly spécifiques, qui peuvent contenir des auto-anticorps, sont susceptibles de médier la pathologie plutôt que la protection (Williams et al., 1996).

Une réponse IgG spécifique aux trypanosomes (principalement IgG1) est provoquée chez les bovins infectés presque par coïncidence avec la réponse IgM. En plus d'avoir une plus grande capacité à développer des réponses humorales spécifiques, les bovins trypano-tolérants se sont avérés capable de maintenir des niveaux de complément plus élevés pendant l'infection à trypanosomes que les bovins zébus sensibles (Authié and Pobel, 1990). La moelle osseuse des races trypano-tolérantes a une capacité intrinsèque plus élevée de répondre à l'anémie (Andrianarivo et al., 1996, 1995).

## 6. Pathogénie

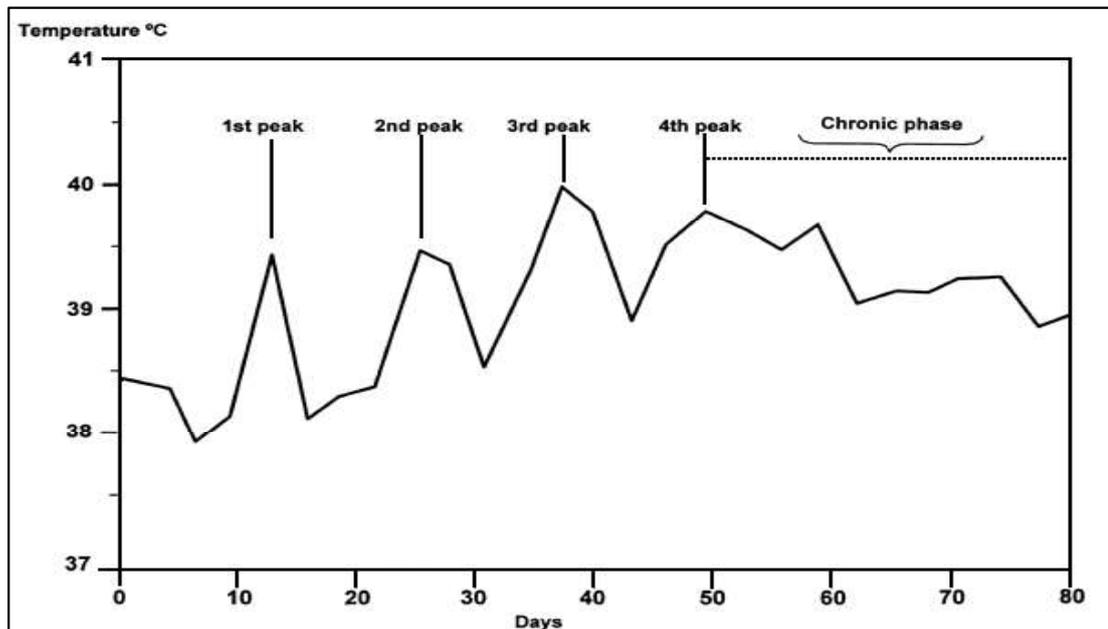
La pathogénie de l'infection par les trypanosomes commence par le développement d'un gonflement localisé, appelé chancre, au site d'inoculation par le vecteur. Le gonflement de la peau est directement associé à la parasitemie (Wolkmer et al., 2009). La taille du gonflement peut varier et ne dépend pas de la virulence des souches infectantes. Il peut

être observé 5 à 8 jours après l'infection et régresse rapidement sans autres signes cliniques.

Du site d'inoculation, les trypanosomes sont drainés vers les ganglions lymphatiques, où ils prolifèrent par fission binaire provoquant une adénopathie. De la lymphe, les trypanosomes poursuivent leur chemin vers le système vasculaire.

Quelques jours après l'infection, la production d'anticorps dirigés contre les VSG, provoquent une lyse des parasites associée à une hyperthermie. Mais certains parasites persistent et modifient leurs antigènes de surface. Ils deviennent indétectables par le système immunitaire et se multiplient, provoquant une nouvelle phase de parasitémie et d'hyperthermie, jusqu'à ce que l'hôte fabrique de nouveaux anticorps spécifiques.

Après plusieurs cycles, l'hôte ne réagit plus à la variation antigénique suite à l'épuisement du répertoire antigénique de *T. evansi*. La variation antigénique devient lente et les pics hyperthermiques correspondants sont plus espacés et de faible amplitude (figure 6).



**Figure 6:** Evolution des pics d'hyperthermie au cours d'une trypanosomose  
(Desquesnes et al., 2013)

L'anémie est l'un des principaux effets pathologiques de la trypanosomose qui est causée par l'hémolyse intra et extra vasculaire. La réaction auto-immune contre les érythrocytes déclenche l'hémolyse (Rickman and Cox, 1983).

L'infiltration et la diffusion de *T. evansi* dans le système nerveux central (SNC) ont été rapporté (Berlin et al., 2009).

La motilité de *T. evansi* dans le sang dépend des approvisionnements adéquats en glucose bien que le pyruvate est facilement utilisé par les tissus de l'hôte, son accumulation dans le sang est directement proportionnelle aux nombres de parasites (Marshall, 1948).

La concentration élevée de pyruvate pourrait conduire à l'épuisement des réserves alcalines, une acidose et une diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Les trypanosomes peuvent se désintégrer dans le sang de l'hôte et libérer une toxine qui est hémolytique pour les érythrocytes. Les toxines acquièrent des lipides via leur capacité à hydrolyser les lipides membranaires de l'hôte (par exemple : lécithine) par libération de phospholipases. Les Phospholipases A2 sont des enzymes à deux propriétés hémolytique et anticoagulante (Nok et al., 1993).

Il semble que la prédominance de l'hémolyse est associée à la diminution de la durée de vie des hématies et une vaste erythrophagocytose. En effet l'anémie a été impliquée dans le développement de la dégénération tissulaire et par conséquent les troubles rapportés chez les animaux infectés par les trypanosomoses. Dans l'infection grave l'apparition de l'anémie est liée à l'apparition des trypanosomes dans le sang et à la gravité associée à la première vague de parasitemie. Une erythrophagocytose intense se produit après l'infection par *T. evansi* qui est essentiellement extravasculaire en raison du déclenchement du système phagocytaire mono-nucléaires lorsque la demi vie des globules rouges est réduite de manière significative (Adamu et al., 2008).

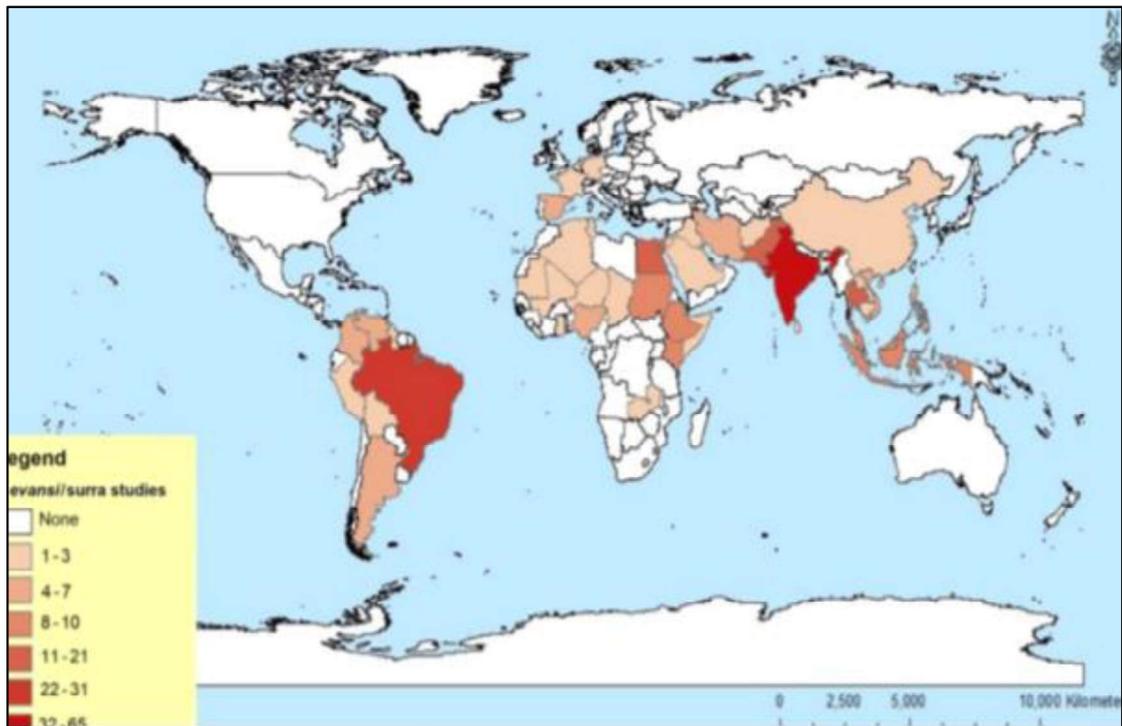
Le parasite envahit le sang de l'hôte puis d'une façon lente le système nerveux centrale provoquant des lésions qui sont à l'origine des signes nerveux de la phase finale de la maladie. La pathogénie de *T. evansi* est compliquée et l'issue fatal de la maladie reste jusque-là mal connu (Habla et al., 2012).

## **7. Épidémiologie et importance économique de l'infection à *T. evansi***

Le surra est largement distribué en Afrique, au Moyen-Orient, en Amérique latine et en Asie avec des cas d'importation sporadiques en Europe (Hoare, 1972; Gutierrez et al., 2010). Elle est l'une des maladies à espèces multiples de la liste B de l'OIE (OIE - World Organisation for Animal Health, 2008a). Cette caractéristique multi-hôte est

attribuée au fait que les vecteurs mécaniques tels que les tabanides n'ont pas de préférence stricte pour l'hôte (Muzari et al., 2010).

Au nord de la limite de la distribution géographique des glossines, le surra est principalement une maladie des dromadaires et des chevaux, mais les bovins et les chèvres sont également très sensibles (Gutierrez et al., 2006). Il existe une influence saisonnière sur les épidémies liées à l'activité saisonnière des vecteurs et à d'autres facteurs tels que le stress dû au surmenage, les pénuries alimentaires et / ou une eau insuffisante ou de mauvaise qualité (Dia et al., 1997; Desquesnes et al., 2013a).



**Figure 7:** Répartition mondiale de *Trypanosoma evansi* basée sur 272 études publiées entre 1906 et 2017 (Aregawi et al., 2019).

La répartition de l'infection à *T. evansi* en Algérie suit celle des dromadaires. Cependant, en raison d'une carence logistique et d'un manque de diagnostics précis pour la maladie, l'épidémiologie et l'importance économique de la maladie ne sont pas bien connues.

Au Moyen-Orient et vers l'Asie, la répartition géographique de *T. evansi* est également étroitement liée à celle des dromadaires. Le surra est principalement présent chez les bovins, les dromadaires, les buffles et les équidés dans de grandes régions de l'Inde (Hasan et al., 2006; Hoare, 1972; Pathak and Khanna, 1995; Sumbria et al., 2014;

Tehseen et al., 2015). En Amérique latine, *T. evansi* est principalement une maladie des chevaux et des bovins et induit des épidémies avec une morbidité et une mortalité très élevées. Les autres espèces domestiques affectées par le surra sont les buffles, les chats, les porcs et les chiens (Stevens et al., 1989; Aref et al., 2013; Rjeibi et al., 2015).

Les réservoirs sauvages d'Amérique latine sont les porcs sauvages (*Tayassu tajacu*), le cerf de Virginie (*Odocoileus virginianus chiriquensis*), le coati (*Nasua nasua*), le cerf de Barbarie (*Mazama satorii*), les chauves-souris vampires (*Desmodus rotundus*), les capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), le porc de Guinée (*Cavia porcellus*), le chien sauvage (*Canis azarae*), l'ocelot (*Felis pardalis*) et les lamas (Desquesnes et al., 2013b).

*T. evansi* n'est pas présent en Australie, mais il peut se propager vers l'est depuis l'Indonésie jusqu'à la Papouasie-Nouvelle-Guinée, puis en Australie (Reid and Copeman, 2000). Les cas de surra en Europe ont été attribués à l'importation de dromadaires des îles Canaries où la maladie a été diagnostiquée pour la première fois en 1997, chez un dromadaire importé de Mauritanie (Gutierrez et al., 2000).

De nombreux dromadaires ont été importés des Canaries vers le continent européen sans examen préalable se sont révélés atteints de *T. evansi* (Gutierrez et al., 2000, 2010). Cela a provoqué deux foyers d'infection à *T. evansi*, en France métropolitaine en 2006 dans une ferme mixte (ovins et dromadaires) et en Espagne en 2008 (Desquesnes et al., 2008; Tamarit et al., 2010).

Le surra présente généralement une nature enzootique et chronique, cependant, des flambées aiguës peuvent survenir lorsque la maladie est introduite dans de nouvelles populations animales sans exposition préalable et en présence du vecteur (Gutierrez et al., 2005; Desquesnes et al., 2008).

*T. evansi* ne peut pas infecter l'homme en raison de sa sensibilité au facteur trypanolytique (TLF) dans le sérum humain normal (NHS), l'apolipoprotéine L-1 (ApoL-1) qui offre une protection innée aux humains contre l'infection par les trypanosomes africains, tels que *T. evansi*, *T. b. brucei* et autres, à l'exception de *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*, qui ont développé des mécanismes de résistance (Vanhamme et al., 2003; Pays et al., 2006; Vanhollebeke et al., 2008).

En Inde, un cas humain de trypanosomose due à *T. evansi* s'est produit chez une personne présentant des mutations dans les deux allèles Apo L-1 qui ont conduit à une interruption inattendue de la traduction des protéines par les codons stop internes qui a entraîné une absence totale d'Apo L- 1 (Joshi et al., 2005; Powar et al., 2006; Vanhollebeke et al., 2006). Plus récemment, une femme au Vietnam, avec des concentrations sanguines apparemment normales d'Apo L-1 fonctionnelle a été diagnostiquée avec une infection à *T. evansi* suggérant que d'autres paramètres de l'hôte pourraient jouer un rôle dans la sensibilité à l'infection à *T. evansi* (Van Vinh Chau et al., 2016).

*T. evansi* est transmis mécaniquement par les insectes suceurs de sang et nécessite une parasitémie élevée de «l'hôte donneur» (Desquesnes et al., 2013b). De tous, la transmission mécanique par des insectes piqueurs tels que les tabanides et les stomoxys est le mode de transmission le plus important (figure 8). Outre la transmission vectorielle et la contamination d'une plaie, la transmission iatrogène causée par l'utilisation d'instruments chirurgicaux non stériles ou d'aiguilles peut être importante, en particulier pendant les campagnes de vaccination et les traitements de masse. Une transmission par voie orale en mangeant des proies infectées a été signalée chez des tigres, des chiens et des rongeurs (Moloo, 1978; Raina et al., 1985; Desquesnes et al., 2013a).

En Amérique latine, les chauves-souris vampires (*Desmodus rotundus*) peuvent agir comme vecteur de *T. evansi*. Ils sont infectés par voie orale lorsqu'ils prélèvent du sang sur une proie infectée. En tant qu'hôte de *T. evansi*, les chauves-souris peuvent développer des symptômes cliniques et mourir au cours de la phase initiale de la maladie. Cependant, chez les chauves-souris qui survivent, les parasites se multiplient dans le sang et se retrouvent dans la salive d'où ils peuvent être transmis à un autre hôte pendant la morsure ( Hoare, 1972; Desquesnes and Dia, 2004).

Récemment, la transmission verticale de *T. evansi* chez les dromadaires naturellement infectés et expérimentalement chez les moutons a été documentée (Campigotto et al., 2015; Narnaware et al., 2016).

Les signes cliniques chez les espèces hôtes sont détaillés ci-dessous dans la section 8.1.

Les effets cumulatifs des différentes pathologies dues à l'infection à *T. evansi* entraînent

de graves pertes économiques en raison de son impact sur la mortalité élevée, la production réduite (lait et viande), les performances de reproduction réduites, la mauvaise qualité de la carcasse et l'immunosuppression chez le bétail. De plus, les dépenses financières des interventions chimiothérapeutiques sont assez élevées (Payne et al., 1991; Pholpark et al., 1999; Reid, 2002; Salah et al., 2015).



**Figure 8: A :** Morphologie générale et détail des antennes de trois important genres : Haematopota (à gauche), Tabanus (au centre) et Chrysops (à droite) (Baldacchino et al., 2014a).

### **8. Diagnostic de l'infection à *T. evansi***

Les tests de diagnostic constituent l'outil de base de toute étude épidémiologique d'une maladie ou de son contrôle. La mise en évidence de l'étiologie associée aux cas cliniques doit être accompagnée avec des méthodes de diagnostic qui permettent la détection de l'infection ou de ses traces chez les animaux alliant sensibilité et spécificité.

Le diagnostic différentiel de la Trypanosomose à *T. evansi* est difficile, une confusion est potentiellement fréquente avec *T. vivax* en Amérique du Sud transmise par voie sanguine et avec *T. equiperdum* en Asie du Sud-Est qui se transmet par voie sexuelle (Monzón et al., 1990; Reid, 2002; Claes et al., 2005).

Les tests de diagnostic des trypanosomes peuvent généralement être regroupés en : i- tests directs qui détectent soit des parasites circulants entiers, soit ses antigènes, son ADN ou ARN, ii- des tests indirects qui détectent la réponse en anticorps de l'hôte à l'infection (Büscher, 2014).

### 8.1. Diagnostic clinique

L'évolution de l'infection à *T. evansi* va des cas sub-cliniques aux cas mortels aigus. La gravité est liée à la différence de virulence des souches individuelles, à la sensibilité de l'hôte, aux conditions épidémiologiques locales et aux facteurs de stress (Desquesnes et al., 2013b; Hoare, 1972).

Chez les espèces hôtes sensibles; ce n'est pas le fardeau parasitaire lui-même, mais l'immunopathologie, dont l'anémie et la pathogénicité hépatique qui provoquent la mortalité et la morbidité (Bosschaerts et al., 2009; Stijlemans et al., 2008).

Les signes et symptômes cliniques de la trypanosomose africaine ne sont pas spécifiques ou peuvent même être obscurs, en particulier chez les races trypanotolérantes. Aucun symptôme n'est pathognomonique et la maladie peut simuler de nombreuses autres infections. Par conséquent, le diagnostic clinique reste seulement présomptif et se repose sur la combinaison de plusieurs signes cliniques survenant chez un hôte sensible dans une situation épidémiologique donnée (Büscher, 2014).

Au site où les trypanosomes sont inoculés par les vecteurs, la multiplication des trypanosomes peut provoquer un gonflement de la peau (chancre) suivi d'une fièvre intermittente (Luckins, 1988). L'anémie, principalement due à une hémolyse extravasculaire est un signe majeur de *T. evansi* (Rickman and Cox, 1983; Stijlemans et al., 2008). Au cours d'une infection tardive, la trypanosomose à *T. evansi* se caractérise par une perte de condition, un œdème des parties inférieures du corps, des plaies urticariennes et des hémorragies pétéchiales des membranes séreuses (Desquesnes et al., 2013a; OIE, 2017).

Les avortements, l'immunosuppression, l'infiltration et la dissémination de *T. evansi* dans le système nerveux central (SNC) avec des symptômes cliniques mortels ont été rapporté (Seiler et al., 1981; Holland et al., 2001, 2003; Berlin et al., 2009; Saleh et al., 2009).

**Chez les dromadaires**, le surra peut être aigu avec une forte fièvre (41 ° C), une faiblesse, une perte d'appétit et de poids, un avortement, un œdème (parties ventrales, du pis ou du scrotum et de la gaine), une anémie avec une muqueuse pâle et des hémorragies pétéchiales ou ecchymotiques et la mort. L'évolution de la maladie est plus souvent chronique (dure souvent 2-3 ans). Parfois, des signes nerveux tels que des convulsions périodiques sont observés (Gutierrez et al., 2006, 2005).



**Figure 9:** Etat générale d'une femelle atteinte de *T. evansi* (anémie sévère, cachexie, mauvaise odeur, larmoiement, œdèmes dans les parties déclives) (cliché personnel)

**Chez les chevaux**, la période d'incubation est de 1 à 8 semaines, après une fièvre fluctuante (41,5 ° C à 44 ° C) qui coïncide avec des pics élevés de parasitémie. Les autres symptômes sont : une faiblesse, une léthargie, une anémie, une perte de poids sévère (souvent accompagnée d'ictère et d'urine très colorée), une éruption cutanée locale ou générale transitoire, des hémorragies pétéchiales vulvaires et muqueuses vaginales et sur la chambre antérieure de l'œil et des paupières, un avortement, locomotion altéré et des œdèmes (sous-maxillaire, abdomen, testicule et pis) (Silva et al. 1995).

Des signes aigus sont souvent observés dans des populations naïves avec des taux de mortalité élevés supérieurs à 50%. Dans les zones enzootiques, les chevaux peuvent présenter un certain niveau de résistance avec des cas chroniques ou infra-cliniques et

des porteurs apparemment sains. Les ânes et les mulets présentent les mêmes symptômes mais plus légers que ceux des chevaux (Silva et al. 1995).



**Figure 10:** Evolution chronique et aigüe du surra chez les chevaux. (A) : Perte de poids et évolution chronique d'un cas de surra en Thaïlande. (B) : Evolution rapide et fatale du surra chez un cheval naturellement infecté en Thaïlande.(Desquesnes et al., 2013b).

**chez les bovins et les buffles,** Le Surra a été considéré comme une maladie bénigne, chronique ou asymptomatique, en particulier en Afrique, au Venezuela et en Amérique latine, où il est parfois même difficile d'infecter les animaux expérimentalement (García et al., 2006). En Inde, des taux de mortalité très élevés (> 90%) ont été signalés. Les signes cliniques courants comprennent la fièvre, l'anémie, les pertes de poids, la production de lait et de viande, l'avortement, l'interruption de la cyclicité œstrale.

Parfois, l'évolution peut être aiguë, entraînant rapidement la mort (Payne et al., 1993; Desquesnes et al., 2013a).



**Figure 11:** Evolution chronique du surra chez des bovins de race locale en Thailand  
(Desquesnes et al., 2013a)

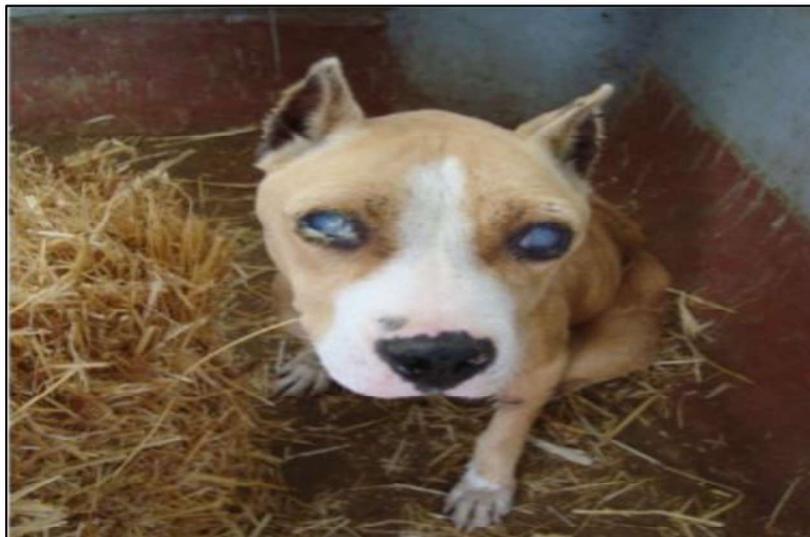
**Chez les ovins**, l'infection naturelle est généralement considérée comme bénigne ou asymptomatique. Dans certains cas, les infections expérimentales peuvent même échouer, mais dans d'autres, elles peuvent entraîner des signes cliniques, principalement de la fièvre (40 ° C), un manque d'appétit et une anémie.

La parasitémie est généralement faible (105 parasites / ml) et diminue jusqu'à ce qu'elle soit indétectable pendant plusieurs mois; cependant, dans certaines circonstances telles que la restriction alimentaire ou le stress lié au transport, la parasitémie peut augmenter dans le sang et des signes cliniques réapparaissent (Desquesnes et al., 2013a).

Le surra **chez les caprins**, peut produire des formes aiguës, subaiguës, chroniques ou subcliniques. Dans des conditions naturelles, les chèvres présentent de légers signes cliniques (Gutierrez et al., 2006). Dans l'infection expérimentale, une parasitémie erratique, une perte de poids et une baisse significative du PCV ont été observées (Ngeranwa et al., 1993, 1991).

**Les chiens** sont très sensibles au surra, présentant souvent des cas aigus avec de forts signes cliniques menant à la mort (dans une semaine à un mois), en particulier chez les

chiens errants qui ne sont pas traités et parfois même malgré les traitements (Herrera et al., 2004; Singh et al., 1993). Les signes cliniques sont une fièvre intermittente (39 ° C – 41 ° C), un œdème (tête, y compris le larynx, la paroi abdominale), une anémie, une faiblesse, un manque d'appétit entraînant une émaciation et, parfois, une parésie des membres postérieurs et une myocardite. Des signes oculaires avec conjonctivite, lacrymation, kératite, opacité cornéenne et / ou signes hémorragiques, dépôts de fibrine dans la chambre antérieure de l'œil; et les parasites dans le liquide aqueux oculaire sont courants (Aref et al., 2013).



**Figure 12** : Kératite bleue purulente bilatérale chez un chien, avec surra (Rjeibi et al., 2015)

Des cas confirmés d'infection à *T. evansi* sont documentés **chez les tigres**. Les tigres cliniquement malades présentaient de l'anorexie, de la constipation, de la léthargie et des convulsions, une respiration rapide, un halètement, une pression sur la tête, un pouls rapide, de la fièvre (Upadhye and Dhoot, 2000). Une éclosion d'infection à *T. evansi* chez quatre tigres, deux jaguars et un léopard a été caractérisée par une mort subite, une détresse respiratoire, un écoulement nasal et des convulsions (Sinha et al., 1971).

L'infection naturelle **chez les chats** est rare, mais l'infection expérimentale de *T. evansi* chez les chats n'a induit que des symptômes bénins, tels que fièvre, apathie, hyporexie et vomissements ainsi que des douleurs musculaires, une hyperprotéïnémie, une hyperglobulinémie et une hypoalbuminémie (Da Silva et al., 2009, 2010).

## 8.2. Diagnostic de laboratoire

### 8.2.1. Tests parasitologiques

Les tests parasitologiques sont spécifiques à 100% et peuvent être utilisés pour le diagnostic de confirmation. Sur la base des caractéristiques morphologiques, la microscopie permet une identification provisoire des espèces de trypanosomes. Les parasites trypanozoon, y compris *T. evansi*, se retrouvent par voie intravasculaire et extravasculaire dans différents tissus, y compris le système nerveux central. Les trypanosomes qui circulent dans le sang sont les plus accessibles pour les examens parasitologiques. Dans la phase chronique d'une infection, la charge parasitaire dans le sang reste souvent inférieure à la limite de détection des techniques microscopiques courantes, ce qui rend la détection des parasites peu sensible (Büscher, 2014).

#### *-Examen du sang a l'état frais :*

Une petite goutte de sang déposée sur une lame propre et recouverte d'une lamelle pour étaler le sang en couche monocellulaire. L'examen est alors pratiqué au microscope optique (X 200) pour détecter toute motilité de trypanosome.

#### *-Goutte épaisse colorée :*

Une goutte de sang déposée à 20 mm d'une extrémité d'une lame propre et un film mince est obtenu par étirement classique. Ce film brièvement séché à l'air ; fixé à l'alcool méthylique et laissé au sec, le frottis doit être ensuite coloré au Giemsa pendant 25 mn, lavée à l'eau et séchée. Les frottis non fixés peuvent être colorés en les recouvrant de May Grunwald pendant 2 mn puis au Giemsa après un lavage. Les lames obtenues seront examinées au microscope à un fort grossissement de (400 à 1000). Cette technique permet des études morphologiques détaillées et l'identification des espèces de trypanosomes. Des techniques de coloration rapide existent également.

#### *-Méthode de concentration de WOO:*

Il s'agit d'un test parasitologique développé par WOO, environ 70 ml de sang EDTA sont introduits par capillarité dans un tube capillaire hépariné (non nécessaire) l'extrémité du tube est comblée par un bouchon de pâte, 5min de centrifugation 10000 tr /mn permettent de séparer les globules rouges, le buffy coat et le plasma. L'hématocrite de l'animal peut ainsi être estimée en pourcentage de la

hauteur du culot d'hématies sur celle du volume du sang total grâce à un micro capillary reader (la mise en évidence du parasite se fait après nettoyage du tube d'hématocrite à l'alcool 75% par observation au microscope optique (X 200) du bufy coat où se concentrent les trypanosomes.

- *La mini technique de centrifugation par échange d'anions (mAECT) :*

Elle sépare les trypanosomes des cellules sanguines sur un gel de chromatographie d'échange d'anions en fonction de leur charge de surface différentielle en fonction du pH et de la force ionique du tampon d'équilibrage du gel. Le tampon charge négativement les cellules sanguines hôtes qui sont ensuite adsorbées sur la colonne échangeuse d'anions, tandis que les trypanosomes neutres ou chargés positivement sont élués, conservant leur viabilité (Lanham and Godfrey, 1970; Lumsden et al., 1979).

Les trypanosomes qui sont élués du gel sont repris dans un tube collecteur en verre ou en plastique transparent qui est centrifugé à basse vitesse (environ 1800 g) pendant 10 minutes concentrer les parasites au fond du tube où les trypanosomes peuvent être observés au microscope sous faible grossissement (10x10). Étant donné que les charges de surface diffèrent entre les espèces de trypanosomes salivaires et que la charge négative sur les érythrocytes varie également selon les espèces de mammifères, le tampon mAECT doit être adapté en fonction de l'hôte et des espèces de trypanosomes attendues (Seaman and Uhlenbruck, 1963; Lanham and Godfrey, 1970).

Un modèle amélioré de colonne et de tube collecteur mAECT a une sensibilité analytique (<30 trypanosomes / ml), est robuste et évite d'avoir à monter le tube collecteur dans l'eau pour un examen microscopique (Büscher et al., 2009). Le mAECT est généralement effectué sur 0,5 ml de sang, mais la centrifugation préalable d'un plus grand volume de sang (jusqu'à 5 ml) et le chargement de la couche leucocytaire sur la colonne mAECT peuvent abaisser la limite de détection à 10 trypanosomes/ml (Camara et al., 2010).

Le film sanguin et les frottis minces et épais colorés sont des techniques d'examen sanguin direct sans aucune étape de concentration. L'inconvénient majeur de ces tests est la faible sensibilité car seuls des niveaux de parasites supérieurs à 100 000 / ml peuvent être détectés (Paris et al., 1982). La préparation et l'examen microscopique des lames colorées prennent du temps (10 à 20 min par lame) et

nécessitent un certain niveau d'expertise pour reconnaître le parasite (Chappuis et al., 2005).

La technique de centrifugation par micro hématocrite (mHCT) et le test de Woo permettent la concentration de trypanosomes dans le sang et est donc une méthode de détection des parasites plus sensible. Cependant, l'identification des espèces de trypanosomes n'est pas évidente bien que la morphologie et en particulier le mouvement caractéristique des parasites puissent être indicatifs. Dans la technique de Woo, le sang est aspiré dans des tubes capillaires recouverts d'anticoagulant et centrifugé à grande vitesse environ 13 000 g) pendant 5 minutes pour concentrer les trypanosomes dans la couche de couche leucocytaire (Woo, 1970).

Lorsque l'identification des espèces est souhaitée, les tubes capillaires peuvent être cassés et la couche leucocytaire étalée sur une lame de microscope pour examen selon Murray (Murray et al., 1977).

Le mAECT est la technique de détection de parasites la plus sensible avec une sensibilité analytique similaire ou supérieure à celle de la plupart des diagnostics moléculaires de la trypanosomiase africaine, mais ne fonctionne bien que pour *T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum*. Il est moins performant pour *T. vivax* et *T. congolense* (Büscher 2014).

### 8.2.2 Tests sérologiques de détection d'antigène

De nombreux groupes de recherche ont tenté de mettre au point des tests de détection d'antigènes pour les trypanosomoses africaines, mais aucun n'a abouti à un test de diagnostic (Liu and Pearson, 1987; Olaho-Mukani et al., 1993; Nantulya, 1994). Les principaux obstacles au développement de tests de détection d'antigène sont : (i) les anticorps de capture VSG universels qui sont difficiles à concevoir, (ii) les concentrations d'antigènes des parasites circulants sont trop faibles pour être détectables avec les formats de test de diagnostic actuels et (iii) le système immunitaire de l'hôte génère des anticorps contre la plupart des antigènes, provoquant la formation de complexes immuns et entravant la capture de ces antigènes.

### 8.2.3 Tests sérologiques de détection d'anticorps

Toutes les infections par des trypanosomes pathogènes induisent des niveaux élevés d'anticorps, spécifiques et non spécifiques. Par conséquent, la détection d'anticorps spécifiques aux trypanosomes chez un hôte peut être exploitée à des fins de diagnostic. Bien que très utile, le sérodiagnostic basé sur la détection d'anticorps présente certaines

lacunes, par exemple, il ne peut pas faire la différence entre l'infection récente et latente car les anticorps spécifiques aux trypanosomes peuvent rester détectables dans la circulation pendant des mois, voire des années après la guérison.

De plus, les anticorps ne deviennent détectables qu'après quelques semaines d'infection. Les anticorps dus à d'autres infections peuvent interagir avec les antigènes dérivés des trypanosomes utilisés dans un test sérodiagnostique (Desquesnes et al., 2007; Van den Bossche et al., 2000; Büscher, 2014).

Les tests de détection d'anticorps les plus efficaces pour le surra sont basés sur une TVA particulière de *T. evansi*, RoTat 1.2. Une TVA est définie par des épitopes très spécifiques du VSG qui sont exposés à la surface d'un trypanosome vivant. Certaines TVA, comme RoTat 1.2, sont exprimées tôt au cours de l'infection par la majorité des souches de *T. evansi* et sont donc appelées prédominantes (Van Meirvenne et al., 1995; Büscher, 2014).

Le VAT RoTat 1.2 a été cloné à partir d'une souche de *T. evansi*, isolée en 1982 d'un buffle d'eau en Indonésie (Songa and Hamers, 1988). La TVA RoTat 1.2 est exprimée par la plupart des souches de *T. evansi* collectées à travers le monde, sauf par *T. evansi* type B et certaines souches de *T. evansi* type A qui n'expriment pas le gène VSG RoTat 1.2 (Claes et al., 2003, 2004; Ngaira et al., 2005, 2004). Actuellement, la plupart des tests de détection d'anticorps utilisent des antigènes natifs mais il existe une tendance encourageante à remplacer ces antigènes natifs par des antigènes recombinants.

- ***Test d'agglutination sur carte pour la trypanosomose: le CATT / T. evansi :***

C'est un test d'agglutination directe recommandé par l'OIE pour le diagnostic du surra. Le test utilise des trypanosomes entiers (*T. evansi* VAT RoTat 1.2) fixes et colorés au bleu de Coomassie. Des antigènes de surface variables et invariables participent à la réaction d'agglutination (Songa and Hamers, 1988; OIE - World Organisation for Animal Health, 2008b). Le kit de test est composé d'antigène lyophilisé, de tampon, de cartes de test en plastique, de spatules, de sérums de contrôle positif et négatif et d'un rotateur. Il est disponible auprès de l'unité de technologie et de production appliquée de l'ITM, Anvers (**Annexe1**). Sous sa forme lyophilisée, l'antigène est stable pendant au moins deux ans à 2–8 ° C. Le test peut être effectué sur une goutte de sang total ou sur du sérum ou du plasma dilué. Les échantillons sont testés en mélangeant 25 µl

d'échantillon avec une goutte d'antigène reconstitué sur une zone de test de la carte de test. Après 5 minutes de rotation à 70 tr / min, le résultat peut être marqué. Lorsque l'agglutination est visible, le test est considéré comme positif. CATT / *T. evansi* convient à la détection des infections précoces et tardives avec une valeur prédictive positive élevée (OIE, 2018). CATT / *T. evansi* est destiné au dépistage du sang, du plasma ou du sérum peu dilué et est donc inévitablement sujet à de faux résultats positifs. Sa précision est meilleure dans les situations où la prévalence de la maladie est relativement élevée (valeur prédictive négative élevée) (Büscher 2014).

- ***Dosage immunosorbant lié aux enzymes: ELISA / T.evansi :***

Il existe sous deux formes recommandées par l'OIE. Le premier utilise RoTat 1.2 VSG purifié (Verloo et al. 2000). Étant donné que l'ELISA est effectuée sur du plasma ou du sérum hautement dilué et qu'il utilise un antigène purifié, sa spécificité intrinsèque est plus élevée que CATT / *T.evansi*. ELISA est réservé aux laboratoires bien équipés avec un approvisionnement régulier en électricité et en eau pure et a besoin de conjugués spécifiques à l'hôte. Pour les bovins, l'utilisation de conjugués monospécifiques anti-IgG est généralement recommandée. Lorsque des conjugués spécifiques ne sont pas disponibles, des protéines non spécifiques capables de se lier au fragment Fc des immunoglobulines, telles que la protéine A, peuvent être utilisées. Le conjugué de protéine A a été validé pour une utilisation chez les dromadaires et fonctionne également bien avec des spécimens de chevaux (Desquesnes et al., 2009; OIE, 2008). Une deuxième variante d'ELISA est basée sur l'extrait hydrosoluble brut d'une souche non clonée de *T. evansi*. Il présente l'avantage de pouvoir en principe détecter les infections à *T. evansi* avec des souches qui n'expriment pas RoTat 1.2. Cependant, il a été démontré qu'il réagit de manière croisée avec d'autres infections telles que *T. cruzi* et est donc moins spécifique que l'ELISA avec RoTat 1.2 VSG purifié (Desquesnes et al., 2007).

- ***Test d'immunofluorescence indirecte (IFAT):***

Ce test est basé sur la réaction d'anticorps dans l'échantillon (sang, sérum, plasma) avec un trypanosome intact, de préférence une population clonée de *T. evansi* RoTat 1.2 cultivée sur des souris, qui sont fixées sur une lame de microscope. Les anticorps qui se lient à ces trypanosomes sont détectés avec un conjugué marqué par fluorescence spécifique à l'espèce (Katende et al., 1987). En général, les conjugués monospécifiques

anti-IgG (chaîne gamma) donnent les résultats les plus spécifiques (OIE, 2018). Comparé au CATT, l'IFAT est plus sensible mais la spécificité est plus faible (Luckins, 1992; Dia et al., 1997). Elle nécessite un microscope à fluorescence et généralement, la préparation d'antigène n'est pas standardisée (Nantulya, 1990). La reproductibilité du test a parfois été mise en doute. Pour ces raisons, l'ELISA est une technique de laboratoire plus recommandée (Ferenc et al., 1990).

#### 8.2.4 Diagnostic moléculaire

Pour surmonter les limites de l'analyse microscopique, des diagnostics moléculaires ont été introduits. Pour des raisons de complexité et d'exigences techniques, le diagnostic moléculaire n'est pas utilisé dans le diagnostic de routine dans la plupart des pays d'endémie. Le matériel génomique des trypanosomes est constitué d'ADN nucléaire et de kinétoplaste (ADNk). Le noyau contient trois types de chromosomes, (a) les chromosomes de la mégabase (1–6 Mo), (b) les chromosomes intermédiaires (200–900 kb) et (c) les minichromosomes (50–150 kb) (El-Sayed et al., 2000).

La détection de l'ARN est le meilleur substitut pour la détection de parasites vivants, car l'ADN des trypanosomes morts peut rester dans la circulation pendant quelques jours. D'un autre côté, l'ARN se dégrade rapidement, ce qui rend le traitement approprié des échantillons plus délicat.

Les tests de détection d'ADN sont basés sur l'amplification d'une variété de séquences codantes et non codantes d'ADN génomique ou kinétoplastique, y compris des séquences hautement et moyennement répétitives ainsi que des séquences à copie unique (Büscher 2014). Pour des raisons de sensibilité, les gènes multicopies sont préférés aux gènes à copie unique ((Desquesnes et al., 2001; Deborggraeve and Büscher, 2012).

Les séquences non codantes pour lesquelles des PCR sont développées sont l'ADN satellite, séquences internes transcrites (ITS1 et ITS2) et les éléments mobiles à insertion répétitive (RIME). L'intérêt de ces séquences non codantes réside dans leur nombre de copies généralement élevé conférant une sensibilité analytique élevée mais avec pour conséquence qu'elles sont plus sujettes à contamination lors de la collecte ou du traitement des échantillons (Desquesnes et al., 2001; Thekiso et al., 2007).

Les gènes d'ADN ribosomal se produisent en plusieurs copies dans des réseaux en tandem. Ils sont constitués d'unités de transcription (TU) séparées par des espaces non transcrits (NTS). L'UT se compose d'une sous-unité ribosomale 18S, d'un espace interne transcrit 1 (ITS-1), d'une sous-unité ribosomale 5.8S, d'un ITS-2 et d'une sous-unité ribosomique 28S (Desquesnes and Dávila, 2002).

Dans la trypanosomose animale où des infections mixtes peuvent se produire, les PCR qui permettent de discriminer les espèces de trypanosomes en une seule fois et dans le même spécimen présentent un intérêt particulier (Büscher 2014). L'ITS1 avec un nombre de copies de 100-200 a une longueur variable selon les espèces de Kinetoplastida, mais est présumée constante au sein d'une espèce (Desquesnes et al., 2001).

Il existe plusieurs variantes de PCR qui ciblent la séquence ITS1 et récemment, les séquences d'amorces ont été modifiées pour améliorer la sensibilité (Fikru et al., 2012). Malheureusement, les tests de PCR ITS1 sont sujets à une amplification non spécifique, en particulier avec le sang de bovin (Fikru et al., 2014). Par conséquent, une approche de PCR «Touchdown», qui utilise des températures d'hybridation amorce-matrice plus strictes, a été introduite (Tran et al., 2014). Dans la PCR Touchdown, la température d'hybridation pendant les premiers cycles de PCR est bien supérieure à la température d'hybridation optimale prédite des amorces, favorisant ainsi l'amplification de la séquence cible spécifique tandis que dans les cycles de PCR suivants, la température d'hybridation est progressivement abaissée à des températures plus permissives (Don et al., 1991; Korbie and Mattick, 2008).

*La 18SPCR-RFLP*, génère des profils de fragments caractéristiques de *T. congolense* (y compris la différenciation des sous-groupes), *T. vivax*, *Trypanozoon* et *T. theileri* (Geysen et al., 2003).

*La PCR TBR1 / 2* amplifie les séquences répétitives des minichromosomes satellites et est considérée comme golden test pour la détection de l'ADN de *Trypanozoon* et permet de détecter aussi 1 à 5 trypanosomes / ml de sang (Masiga et al., 1992; OIE, 2008).

Dans le but de développer un test PCR spécifique qui serait capable de distinguer *T. evansi* des autres membres du sous-genre *Trypanozoon*, une PCR ciblant le gène RoTat 1.2 VSG a été proposée (Urakawa et al., 2001). Une évaluation approfondie sur une

grande collection de taxons Trypanozoon avec cette PCR a montré une sensibilité analytique inférieure de 10 trypanosomes par ml de sang. Grâce à cette PCR, Claes et ses collègues ont pu montrer que la plupart des isolats de *T. equiperdum*, à l'exception de BoTat 1.1 et OVI, sont en fait mal classés des souches de *T. evansi* (Claes et al., 2004).

Étant donné que le gène RoTat 1.2 est absent de *T. evansi* type B, la PCR spécifique RoTat 1.2 ne sera pas en mesure de détecter des infections par ce taxon (Claes et al., 2004; Ngaira et al., 2004, 2005). Pour le diagnostic et l'identification des infections à *T. evansi* de type B, des amorces ciblant les séquences d'ADNc de mini-cercle spécifiques de type B et JN 2118Hu VSG ont été décrites (Ngaira et al., 2005; Njiru et al., 2006).

L'amplification isotherme à boucle (LAMP) de l'ADN a été introduite comme alternative aux tests PCR complexes nécessitant un cycle de température (Njiru, 2012). Pour le diagnostic de l'AAT, des tests LAMP ciblant VSG RoTat 1.2, VSG JN 2118Hu et RIME ont été développés (Kuboki et al., 2003; Njiru et al., 2008, 2010; Thekiso et al., 2007).

## 9. Moyens de lutte

Le control d'une maladie vectorielle est classiquement divisé en deux sections : control de l'agent pathogène et le control du vecteur. Plusieurs méthodes de control de la transmission doivent être combinées pour prévenir l'infection.

En absence de vaccin contre les trypanosomes, due au large répertoire de l'antigène variable de surface, le control de la maladie est principalement basé sur l'utilisation des trypanocides et des méthodes préventives pour protéger l'animal contre l'infection (Desquesnes et al., 2013a).

### 9.1 La chimiothérapie

Elle permet de limiter les manifestations cliniques de la maladie mais la durée de la protection conférée reste très courte. Les trypanocides utilisés pour le traitement des trypanosomes sont incapable de traverser la barrière hémato-encéphalique, ces molécules restent peu efficaces et mal adaptées. Les parasites peuvent traverser cette barrière et s'échapper au traitement puis retourner au courant sanguin plus tard. Les principaux trypanocides utilisés sont : diminazene, aceturate (DA), isometamidium chloride (ISM), cymelarsan, suramin et quinapyramine (Desquesnes et al., 2013a).

Deux injections de cymélarsan (0,5 mg / kg pc), avec un intervalle de 1 mois, sont recommandées pour contrôler les épidémies de *T. evansi* dans les zones non enzootiques (Gutiérrez et al., 2014). L'utilisation alternative de DA et ISM constitue une « paire sanitaire », ce qui signifie qu'une fois qu'une résistance se développe à l'un des médicaments, l'autre médicament est toujours efficace pour contrôler l'infection.

Le contrôle de l'AAT est entravé par l'émergence de trypanosomes résistants aux médicaments (Geerts et al., 2001; Mäser et al., 2003). L'utilisation intensive de DA, ISM, quinapyramine et suramine a entraîné l'apparition de souches résistantes (Leach and Roberts, 1981; Kinabo, 1993).

La résistance aux médicaments peut être innée (individus résistants sans exposition préalable au médicament particulier) ou acquise (en raison de l'exposition / pression du médicament, de la résistance croisée ou parfois par mutagenèse) (Osman et al., 1992). La résistance au DA et à l'ISM est signalée chez diverses espèces de *Trypanosoma* de différentes parties de l'Afrique (Kinabo, 1993; Dagnachew et al., 2015; Moti et al., 2015).

La résistance à l'ISM est principalement associée à la résistance croisée à l'homidium, car ce sont des composés structurellement apparentés qui partagent le même mécanisme d'absorption (Peregrine et al., 1997). Des résistances de *T. evansi* à la suramine ont été observées expérimentalement au Soudan et en Chine, et des dromadaires au Kenya (Otsyula et al., 1992; El Rayah et al., 1999; Zhou et al., 2004).

Aucune résistance croisée de la suramine avec les arsenicaux, les diamidines, la quinapyramine ou l'isométymidium n'a été observée (Ross and Barns, 1996; El Rayah et al., 1999; Zhou et al., 2004). Jusqu'à présent, il n'y a aucun rapport sur le développement d'une résistance contre le cymélarsan. Cependant, dans le cas des infections nerveuses, des doses élevées (0,5 mg / kg pc), chez les chevaux et les chiens (2 mg / kg pc), n'ont pas permis de guérir les animaux (Berlin et al., 2010; Desquesnes et al., 2011, 2013b). Des doses plus faibles de cymélarsan n'ont pas permis de traiter les cas de surra chez les buffles (0,25 mg / kg à 3 mg / kg), les chèvres (0,3 mg / kg), les souris (0,25 mg et 0,5 mg / kg) et les bovins (0,5 mg / kg) (Zr and K, 1991; Zweygarth et al., 1992; Syakalima et al., 199). Les clones de *T. evansi* qui ont développé une résistance au cymélarsan chez la souris ont montré une résistance croisée au diminazène et à la

pentamidine (Zweygarth and Kaminsky, 1990; Osman et al., 1992).

## **9.2 La lutte contre le vecteur**

La circulation des vecteurs peut être limitée par l'utilisation des insecticides, les techniques de stérilisation des insectes, les piégeages, la réduction des gîtes de pontes, brulage des végétaux ou de fumier dont les fumées éloignent les insectes. Le control des vecteurs mécaniques est difficile en raison de la diversité des espèces et leur grande mobilité et prolificité (Desquesnes et al., 2013a).

La lutte contre les tabanides est rarement tentée, car elle est coûteuse, insatisfaisante, non durable et n'offre pas une protection à 100% contre l'infection (Desquesnes et al. 2013a). Les pièges Nzi et Vavoua sont utilisés pour étudier les insectes et surveiller les campagnes de lutte. Le piège Nzi peut capturer de grandes espèces de tabanidés et des Stomoxys, tandis que le piège Vavoua capture de petites espèces de tabanidés, comme les Chrysops (mouches des cerfs) et les Stomoxys (Mihok, 2002).

## **9.3 Prévention de l'introduction dans les zones indemnes**

Comme il a été décrit en Espagne et en France des cas cliniques ou inapparents peuvent être responsable de l'introduction du parasite d'une zone infectée à une autre indemne. La détection de l'infection est basée sur des analyses de laboratoires comme il a été décrit par L'Organisation Mondiale de la Santé Animal (WOAH) dans le manuel terrestre (OIE, 2008).

# **Chapitre 2 : Plan de travail et objectifs**

## Chapitre 2 : Plan de travail et objectifs

### 1. Avant-propos

Le surra a été identifié dans tout le continent africain où les dromadaires sévissent. *T. evansi* est à l'origine d'importantes pertes dans la production animale, ce qui constitue une grande menace pour une agriculture et un développement rural durables dans les pays enzootiques. La Trypanosomose à *T. evansi* fait partie des vingt maladies ayant le plus grand impact sur les populations pauvres (Perry, 2002).

En Algérie, le statut du surra est mal connu, peu d'études ont été réalisées chez les dromadaires et les chevaux (Benaïssa et al., 2017; Benfodil et al., 2019; Bennoune et al., 2013; Boushaki et al., 2019). Ainsi une partie de cette thèse de doctorat est axée sur la prévalence de *Trypanosoma evansi* chez plusieurs espèces de mammifères et l'évaluation des facteurs de risques associés au sud de l'Algérie.

Les techniques de diagnostic utilisées dans les études faites en Algérie sur *T. evansi* sont l'observation directe par microscopie et le CATT/*T. evansi*. La maladie est donc sous-estimée en absence d'études épidémiologiques, utilisant un échantillon assez représentatif, des tests de diagnostic suffisamment puissants, sur des principaux hôtes et sur les réservoirs.

Les signes cliniques sont à titre indicatif du surra. Le diagnostic de certitude ne peut être confirmé que par des examens de laboratoire. Des examens parasitologiques sont généralement effectués par observation microscopique d'une goutte de sang étalée sur une lame ou de liquide céphalo-rachidien (dans le cas des signes nerveux) (Desquesnes et al., 2013a).

Des tests sérologiques sont très utiles voire indispensable dans le cas de la trypanosomose. Les techniques sérologiques répertoriées dans le Manuel terrestre de l'organisation mondiale de la santé animale (OIE) de 2008 sont les tests ELISA : ELISA RoTat 1.2 et ELISA/Whol cell lysate, le test d'agglutination sur carte (CATT/*T. evansi*) et le test d'immuno-trypanolyse (TL).

L'inconvénient majeur des tests sérologiques est la réaction croisée avec les anticorps non spécifiques causée par d'autres espèces de trypanosoma et des anticorps spécifiques qui peuvent persister quelques semaines après le traitement(OIE, 2017).

Les tests moléculaires ont la capacité de détecter L'ADN ou l'ARN spécifiques du parasite. En Outre, L'ADN et l'ARN parasitaires disparaissent quelques jours après un traitement efficace. Les tests moléculaires permettent d'identifier les différents taxons de trypanosomes : *T. evansi* (type A), *T. brucei*, et *T. equiperdum*. Ainsi que *Trypanosoma evansi* (type B) (Claes et al., 2004; Njiru et al., 2006; Carnes et al., 2015).

Le teste moléculaire recommandés par l'OIE est la PCR TBR qui cible une séquence de 177 pb présente chez les Trypanozoon (Masiga et al., 1992; OIE, 2008). D'autres recherches ont rapporté l'importance de cibler d'autres séquences des deux gènes ITS1 et ARN 18S, qui permettent d'identifier différents taxons de trypanosomes (Deborggraeve et al., 2011; Desquesnes et al., 2001).

Ainsi, la deuxième partie de cette thèse est axée sur l'évaluation et la comparaison entre six tests de diagnostic de *T. evansi* (TL, ELISA / RoTat 1.2, ELISA / WCL, CATT / *T. evansi*, qPCR 18S et PCR ITS1) chez diverses espèces de mammifères dans la wilaya de Ghardaïa.

## 2. Objectif général

Ce travail a été entrepris dans le but d'étudier l'épidémiologie de la trypanosomose à *Trypanosoma evansi* chez diverses espèces de mammifères et la comparaison entre les différents tests de diagnostic, au sud de l'Algérie.

## 3. Objectifs spécifiques

1. Déterminer la situation épidémiologique du surra chez les dromadaires, les équidés, les ruminants et les chiens au Sud de l'Algérie ;
1. Elaborer des hypothèses sur les facteurs de risque qui peuvent augmenter le taux d'infestation par *T. evansi* chez les équidés dans la wilaya d'El-Bayadh;
2. Elaborer des hypothèses sur les facteurs de risque qui peuvent augmenter le taux d'infestation par *T. evansi* chez les dromadaires dans la wilaya de Ghardaïa.
3. Etudier la concordance entre les tests de diagnostic sérologiques et moléculaires de *T. evansi* chez diverses espèces de mammifères dans la wilaya de Ghardaïa ;

4. Evaluer la sensibilité et la spécificité des différents tests sérologiques et moléculaires de *T.evansi* chez diverses espèces de mammifères afin d'identifier les meilleurs tests de dépistage de l'infection.

#### 4. Plan d'étude

Notre étude épidémiologique est de type transversal, elle a été menée sur un échantillon de 754 mammifères domestiques : 161 dromadaires, 93 chevaux, 127 bovins, 168 ovins, 129 caprins, et 76 chiens dans la wilaya de Ghardaïa ainsi que 206 équidés (177 chevaux et 29 ânes) dans la wilaya d'El-Bayadh.

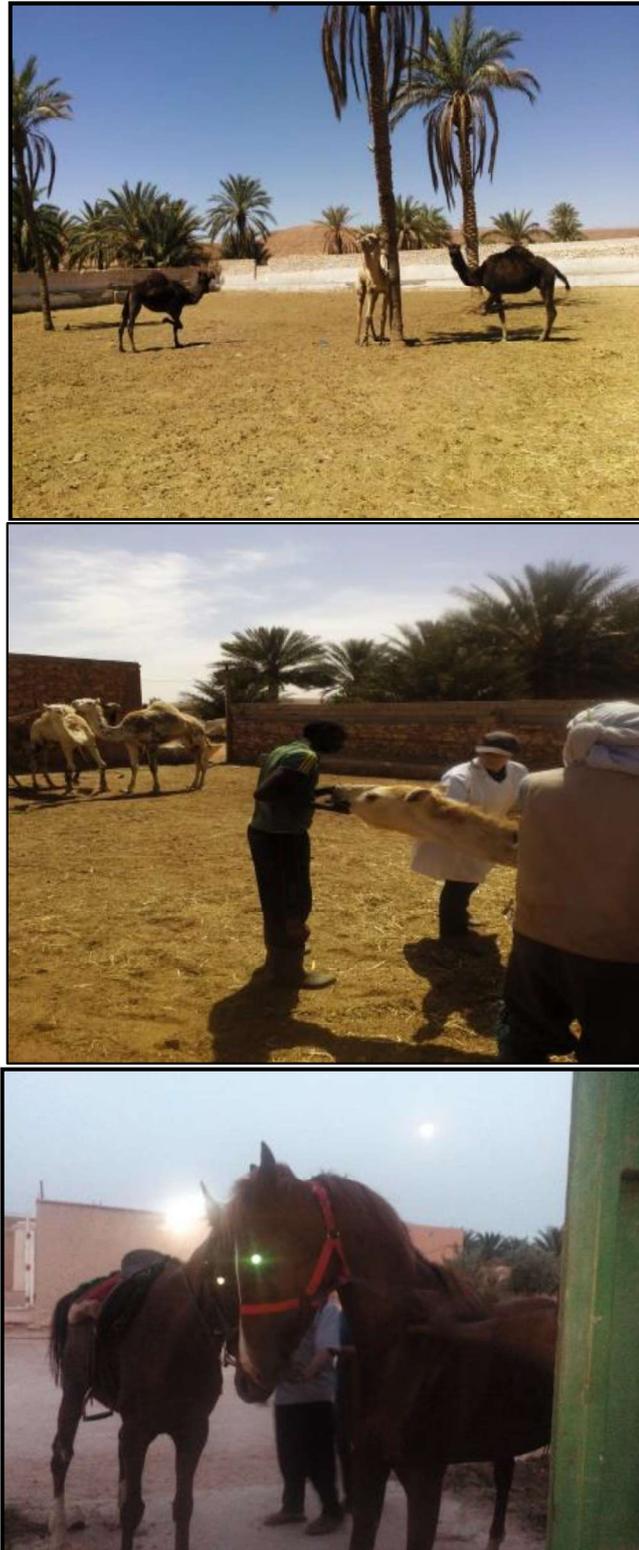
La wilaya d' El-Bayadh est située au sud-ouest de l'Algérie, elle s'étend sur une superficie de 71 697 km<sup>2</sup>, soit 3% du territoire national. La wilaya est constituée de huit Dairates et vingt-deux communes. Elle est limitée au nord par Saida et Tiaret, à l'Est et au Sud-Est par Laghouat, Ghardaïa et Adrar, à l'Ouest et au Sud-Ouest par Sidi Belabbés, Naâma et Bechar. Le territoire d'El-Bayadh cadre un espace délimité en longitude par 0° (méridien de Greenwich) à 2° E et en latitude par 31° à 34° N.

La wilaya de Ghardaïa est assise sur une superficie de 86.560 km<sup>2</sup>, soit 4% du territoire national. Elle est située dans la partie septentrionale et centrale du Sahara entre 4° et 7° de longitude Est et 35° et 36° de latitude Nord. La wilaya de Ghardaïa est limitée au nord par les wilayas de Laghouat et de Djelfa, à l'Est par la wilaya d'Ouargla, au Sud par la wilaya de Tamanrasset et à l'Ouest par les wilayas d'El Bayadh et d'Adrar. Le relief est un sous ensemble de composants géographiques dont les principaux sont les suivants : le grand Erg oriental, la hamada et les vallées qui sont représentées par la vallée du M'ZAB. Le caractère fondamental du climat Saharien est la sécheresse de l'air, de fortes températures s'enregistrent en été (20-45°C), ces dernières diminuent considérablement en hivers.

Une fiche technique a été établie pour chaque animal prélevé, contenant des informations sur les caractéristiques physiques (le sexe, l'âge, la race, le mode d'élevage, l'habitat), les caractéristiques environnementales (présence de points d'eaux, de dromadaires et de végétation) et le statut sanitaire (historique d'avortements, présence de signes cliniques, vaccination, vermifugation).

Un examen clinique a été réalisé pour chaque animal dans le but de rechercher d'éventuels symptômes cliniques liés à la trypanosomose (anémie, ictère, perte de poids, signes nerveux). Les prélèvements ont été réalisés sur des animaux contentionnés par leurs propriétaires. Une compression manuelle est exercée à la base du cou puis une ponction veineuse à l'aide d'une seringue est effectuée pour recueillir le sang dans deux types de tubes (tubes secs et tubes EDTA). Une centrifugation à 3000 T/mn pendant 10 minutes a été effectuée pour les tubes secs afin de récupérer le sérum. Les sérums (tubes eppendorfs) et le sang totale (tubes EDTA) ont été conservés à -20°C jusqu' au moment de l'analyse.





**Figure 13:** Activités sur le terrain: Contention, enregistrement des données sur les animaux, collecte d'échantillons de sang

Après extraction d'ADN à partir du sang totale, différents types de tests de diagnostic moléculaire ont été réalisés. Ces tests de diagnostic ont permis l'évaluation

de la prévalence du surra et plusieurs groupes de *Trypanosoma* affectant les mammifères domestiques (*Trypanosoma sp*, *Trypanozoon* et *Trypanosoma evansi* type B).

Les échantillons de sang réalisés dans la wilaya d'El-Bayadh sur 208 équidés ont été analysés en utilisant le CATT/*T. evansi* au niveau de l'école nationale supérieure vétérinaire d'Alger. Les échantillons prélevés au niveau de wilaya de Ghardaïa (754 animaux domestiques) ont été analysés en utilisant des tests sérologiques et moléculaires (TL, ELISA / RoTat 1.2, ELISA / WCL, CATT / *T. evansi*, PCR 18S et PCR ITS1) au niveau du laboratoire de référence de l'OIE pour le diagnostic du surra à l'institut de médecine tropicale de Belgique.

Des tests statistiques spécifiques ont été réalisés avec le logiciel R (version 3.5.1, R Foundation for Statistical computing, Vienne, Autriche): (i) la régression simple et la régression multi variée pour identifier les facteurs de risques associés à la trypanosomose à *T. evansi*. (ii) le Cohen kappa pour évaluer la concordance entre les différents tests sérologiques et moléculaires. (iii) l'approche des modèles à classes latentes (LCA: Latent Class Analysis) pour faire une estimation de la sensibilité et la spécificité de chaque test de diagnostic.

Les résultats de cette étude sont faits l'objet de trois publications internationales cités ci-dessous. Une discussion générale et de quelques recommandations et perspectives ont été émises.

Le volet épidémiologique est représenté par les articles suivants :

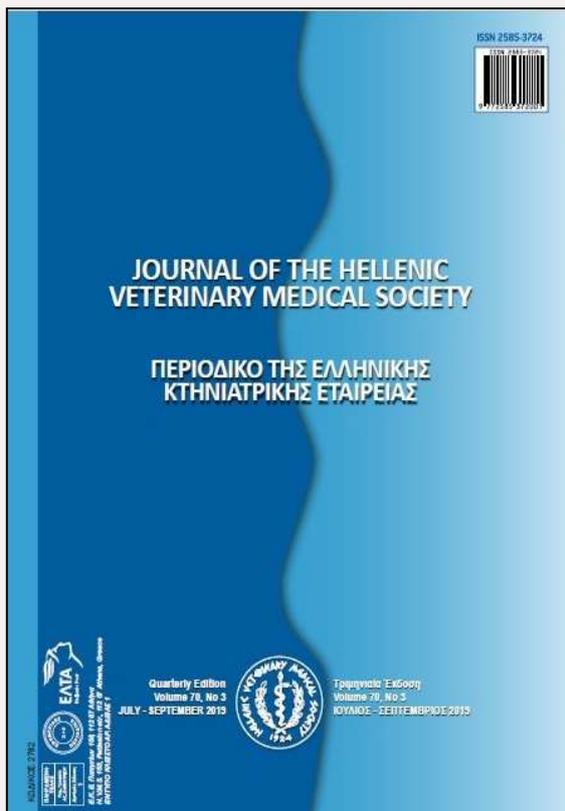
1. Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria. (publié dans: Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society, 70, 1631-1638 ).
2. Assessment of *Trypanosoma evansi* prevalence and associated risk factors by immune trypanolysis test in camels from Ghardaïa district, South Algeria. (publié dans: veterinary parasitology: Regional studies and reports, 22, 100460).
3. La comparaison entre les tests sérologiques et moléculaires pour le diagnostic de *T. evansi* chez les mammifères domestiques est présentée dans l'article suivant :

4. Comparison of serological and molecular tests for detection of *Trypanosoma evansi* in domestic animals from Ghardaïa district, South Algeria. (publié dans: veterinary parasitology 280, 10908).

**Chapitre 3: Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria.**

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol. 70, 2019



### Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria

- BENFODIL K. Higher National Veterinary School, Oued Smar, Algiers, Algeria
- ANSEL S. Higher National Veterinary School, Oued Smar, Algiers, Algeria
- MOHAMED-CHERIF A. Higher National Veterinary School, Oued Smar, Algiers, Algeria
- AIT-LOUDHIA K. Higher National Veterinary School, Oued Smar, Algiers, Algeria

<http://dx.doi.org/10.12681/jhvms.21786>

Copyright © 2019 K. BENFODIL, S. ANSEL, A. MOHAMED-CHERIF, K. AIT-LOUDHIA



#### To cite this article:

BENFODIL, K., ANSEL, S., MOHAMED-CHERIF, A., & AIT-LOUDHIA, K. (2019). Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 70(3), 1631-1638. doi:<http://dx.doi.org/10.12681/jhvms.21786>

## Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria

K. Benfodil, S. Ansel, A. Mohamed-Cherif, K. Ait-Oudhia

Higher National Veterinary School, Oued Smar, Algiers, Algeria

**ABSTRACT.** *Trypanosoma evansi* is a parasite that causes surra in a variety of wild and domestic animals and is mainly transmitted by biting flies in Africa, Asia and Latin-America. Horses infected by *Trypanosoma evansi* present a chronic weight loss, icterus, oedema, anemia, abortions and neurological troubles. Due to this parasite, cases of human trypanosomiasis have been reported in different countries by contacting with infected animals. In this study, 206 healthy equines (177 horses and 29 donkeys) from El-Bayadh district, located in southwest Algeria, were tested for the presence of parasites in blood using Giemsa-stained blood films and for the presence of antibodies against *T. evansi* using CATT /*T. evansi*. While none of the equines showed detectable parasites in the blood, the individual seroprevalence of *T. evansi* was found to be 46.6% (CI 95%, 40.7-54.4%). Out of 98 positives samples, 56.1% (55/98) were shown at level 1 (+), 27.5% (27/98) at level 2 (++) and 16.3% (16/98) at level 3 (+++). The results show that out of 177 tested horses, 80 were seropositive to *T. evansi*, 45.2% (CI 95%, 37.8-52.5%) and out of 29 tested donkeys, 18 were seropositive to *T. evansi*, 62.1% (CI 95%, 44.4-79.7%). A questionnaire for the owners, targeted to associate risk factors for surra in horses, showed that environmental factors that are favorable for Tabanids, such as water and vegetation, but also promiscuity with dromedaries were positively associated with the seroprevalence rate in the horses. El-Bayadh district is a highly endemic region for surra in Algeria.

Keywords: *Trypanosoma evansi*, Prevalence, Horses, Donkeys, Algeria

Corresponding Author:  
Karima Benfodil  
ENSV, PB 161 Rue Issad Abbes, Oued Smar, Algiers, Algeria  
E-mail address: k.benfodil@univ-bouira.dz

Date of initial submission: 08-10-2018  
Date of revised submission: 15-01-2019  
Date of acceptance: 08-02-2019

## INTRODUCTION

*Trypanosoma evansi* was first identified in India where it caused an endemic disease known as “surra” in equines and camels (Evans, 1880-1881). Since then, this parasite has been found to infect many more domestic and wild animals, such as bovines, small ruminants and dogs (Fernandez et al., 2009, Desquesnes et al., 2013). Surra is widespread throughout Africa (Hilali et al., 2004, Birhanu et al., 2015, Fikru et al., 2015); Asia (Tuntasuvan et al., 2003, Hasan et al., 2006); and Latin-America (Hoare, 1965) and even shows occasional outbreaks in Europe (Tamarit et al., 2010). The disease is transmitted mechanically by insect vectors such as *Tabanus* and *Stomoxys* (Luckins, 1988, Brun et al., 1998) and also by vampire bats (*Desmodus rotundus*) in South America (Desquesnes et al., 2013).

Surra is a neglected tropical disease with devastating clinical impacts for the affected animals. Infected Horses with *T. evansi* have fever usually associated with parasitaemia, chronic weight loss, icterus, oedema, anemia, abortions and neurological deficits (Gardiner and Mahmoud, 1992). The parasite can cross the blood brain barrier and cause ataxia, hyperexcitability and progressive paralysis of hind quarters (Rodrigues et al., 2009). In contrast, *T. evansi* infected donkeys present in general a subclinical infection (Mahmoud and Gray, 1980). In Brazil, losses due to mortality and treatment in equines infected by *Trypanosoma evansi* have been estimated to amount to 2.4 million dollars per year (Herrera et al., 2004). Human trypanosomiasis due to *T. evansi* has been reported in different countries (Joshi et al., 2005, Powar et al., 2006, haridy et al., 2011). A transmission by ingestion of meat from infected animals has been demonstrated in Vietnam (Van Vinh Chau et al., 2016).

In Algeria, there is little information about the prevalence of surra in most animals and districts. One previous article reported a 14% prevalence of the parasite in blood smears of camels in southwest Algeria (Bennoune et al., 2013).

The objectives of this study were twofold: first, to determine the prevalence of *T. evansi* parasites and antibodies in equines in El-Bayadh region and second, to associate physical and environmental risk factors for contracting surra in equines using a questionnaire.

## MATERIALS AND METHODS

### Study design and sample collection

EL-Bayadh district is located on the southwest of Algeria. It covers a total area of 71 697 km<sup>2</sup> (3 % of national territory) between 33°40'49" N and 1°01'13" E. The district consists of three distinct agro-climatic zones: high plains, near saharan and saharan atlas.

The population of horses and donkeys in El-Bayadh region is about 1250 and 1897 heads, respectively (MADR, 2016).

The study is achieved during March 2016. A number of 206 equines have been collected from the three agro-climatic zones.

A total of 177 horses and 29 donkeys were sampled, 139 males (121 horses and 18 donkeys) and 67 females (56 horses and 11 donkeys). These animals are divided into 3 different classes according to their age: < 5 years (104 horses and 17 donkeys); 6 to 11 years (58 horses and 12 donkeys) and 15 horses older than 11 years old. Different breeds of horses were sampled: Barb (n=155), Arab/barb (n=22). The chosen horses were used either for racing (n=10), or for pleasure riding (n=167). Donkeys were used for working.

Blood samples were obtained via a jugular vein by using 10 ml vacutainer tubes (which contained no anti-coagulants or preservatives), and then centrifuged at 3000 rpm for 10 min to get serum. The serum was collected in 1.5 ml Eppendorf tubes and kept at -20 °C until analysis by CATT/*T. evansi*.

### Questionnaire

A case study has been done for each sampled animal. It contains information for the physical characteristics (gender, age, breed, purpose and herd structure), the environmental characteristics (promiscuity with dromedaries, contact with watering points and vegetation) and health care (vaccination, vermifugation). Each animal was examined for clinical signs of trypanosomiasis (anemia, icterus, oedema, weight loss and neurological signs).

### Blood smears

Blood samples were collected into sterile vacuum tubes from the jugular vein of each animal. A blood film was prepared for each animal sampled. The smear was fixed by May-Grunwald stain for 3 minutes. It was washed with distilled water and then covered by

Giemsa stain for 30 minutes and again washed with distilled water to eliminate excess of stain. The slides were left to dry and examined with a light microscope by immersion oil at objective X100.

### Serology

The CATT /*T. evansi*<sup>TM</sup> (Card agglutination test for trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi*) (Prince Leopold Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium) is a direct agglutination test used for detection of specific antibodies in blood, plasma and sera. It is included in the terrestrial manual of the word organization for animal health. The performance of the CATT /*T. evansi*<sup>TM</sup> was evaluated with two complement fixation tests in horses in Kazakhstan, the results determined the sensitivity of the kit at 80.2% and the specificity at 98.5% (Claes et al., 2005).

The test was used for serodiagnostic of trypanosomiasis due to *T. evansi* according to the manufacturer's instructions. Briefly, the agglutination reaction is done on card composed of 10 circles. In each circle, 25µl of diluted sera and one drop of Ag (about 45µl) are deposited and then mixed. Once the ten mixtures were made, the card was placed on an electric rotator at 70 rpm for 5 minutes. Each card had two circles for the positive and negative controls delivered by the manufacturer. Samples were considered positives when they have a blue granular agglutination. Agglutination levels were scored as: -, ± (negatives) or +, ++, +++ (positives).

### Statistical analysis

The seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in horses and donkeys were calculated as the number of seropositive animals divided by the total of animals sampled. For risk factors analysis, the independent variables were subjected to univariate analysis which was performed using the chi<sup>2</sup> test (n>5) or Fisher's exact test (n<5). The P value < 0.05 was considered statistically significant. Associations between individual animal serostatus and independent variables were assessed using logistic regression. A backwards stepwise approach was used to find the best fitting model to describe the dataset. Multivariate model selection was based on the Akaike information criterion (AIC) and the best model was selected using the lowest AIC. The P value, odds ratio with 95% CI for explanatory variables were also calculated. All analyses were carried out using RStudio (version 1.1.383, RStudio Inc., Boston, MA).

## RESULTS

### Blood smears

All the examined blood smears (177 horses and 29 donkeys) were negative for the presence of *Trypanosoma evansi*.

### Serology

Out of 206 samples (177 horses and 29 donkeys) tested by CATT /*T. evansi*, 98 were found to be seropositive. Among the 98 seropositive samples, agglutination reactions were scored level 1 (+) in 56.1% (55/98), level 2 (++) in 27.5% (27/98) and level 3 (+++) in 16.3% (16/98). Out of 177 tested horses, 80 (45, 2% [CI 95%, 37.8-52.5%]) were seropositive for *T. evansi*: 27% (47/177) scored level 1 (+), 11% (20/177) level 2 (++) and 8% (14/177) level 3 (+++).

Out of 29 tested donkeys, 18 (62.1% [CI 95%, 44.4-79.7%]) were seropositive for *T. evansi*: 28% (8/29) scored level 1 (+), 24 % (7/29) at level 2 (++) and 7% (2/29) at level 3 (+++).

### Risk factors

#### Horses

Results of the univariate analysis of physical and environmental variables compared to the prevalence of *Trypanosoma evansi* infection in horses (*Equus caballus*) in El-Bayadh region are shown in table 1. Seropositivity for *T. evansi* in horses was detected in all three agroclimatic zones of EL-Bayadh district. The highest seroprevalence rate was founded in the high plains area: 71.8% (CI 95%, 65.6-78.09%), followed by the near-Saharan area: 41.67% (CI 95%, 34.8-48.5%), while the lowest rate was observed in the Saharan Atlas: 26.9% (CI 95%, 20.8-33.1%). The area's in the agro-climatic zones showed a significant association with seropositivity (P= 0.00001). Female horses had higher seropositive rates than male horses, with 57.1% (CI 95%, 44.2-70.1%) versus 39.66% (CI 95%, 30.9-48.4%) respectively. There was a significant association between gender and seropositivity (P = 0.029).

The horses that avoided promiscuity with dromedaries had a lower seropositivity rate 33.3% (CI 95%, 21.1 – 45.6%) than horses that had contact with dromedaries 50.8% (CI 95%, 41.9-58.9%) . The association between promiscuity with dromedaries and seropositivity was significant (P = 0.028).

**Table 1.** Univariate analysis of *Trypanosoma.evansi* infection in horses (*Equus caballus*) compared to physical and environmental variables

Risk factors	Category	No	Positive No	Seroprevalence % (95% CI)	P-value
Age	≤ 5	106	46	43.4 (34 – 52.87)	0.258
	6 - 11	58	29	50 (37.1 – 62.9)	
	> 11	15	4	26.7 (4.3 – 49)	
Gender	Male	121	48	39.7 (30.9 – 48.4)	0.029
	Female	56	32	57.1 (44.2 – 70.1)	
Breed	Barbe	155	69	44.5 (36.7 – 52.4)	0.628
	Arabe-Barbe	22	11	50 (29.1 – 70.9)	
Housing	Box	10	2	20 (23.6 – 28.1)	0.099
	Stable	167	78	46.7 (16.1 – 26.2)	
Purpose	Racis	10	2	20 (4.8 – 44.8)	0.099
	Hobies	167	78	46.7 (39.1 – 54.3)	
Promiscuity with Dromedaries	Yes	120	61	50.8 (41.9 – 59.8)	0.028
	No	57	19	33.3 (21.1 – 45.6)	
Watering points	Yes	133	66	49.6 (41.1 – 58.1)	0.039
	No	44	14	31.8 (18 – 45.6)	
Vegetation	Yes	157	76	48.4 (40.6 – 56.2)	0.000000
	No	20	4	20 (2.5 – 37.5)	
Zone	High Plains	64	46	71.8 (65.6-78.1)	0.00001
	Saharan Atlas	89	24	26.9 (20.8 – 33.1)	
	Near Sahara	24	10	41.7 (34.8 – 48.5)	

Univariate analyses ( $\chi^2$  test for significance)

**Table 2:** Univariate analysis of *Trypanosoma.evansi* infection in donkeys (*Equus asinus*) compared to physical and environmental variables

Risk factors	Category	No	Positive No	Seroprevalence % (95% CI)	P-value
Age	< 5	17	12	70.6 (48,9-92,2)	0,438
	6 - 11	12	6	50 (21,7-78,3)	
Gender	Male	18	10	55.5 (32,6-78,5)	0,448
	Female	11	8	72.7 (32,9-93,9)	
Promiscuity with Dromedaries	Yes	20	12	60 (38,5-81,5)	1
	No	9	6	66.7 (35,9-97,5)	
Watering points	Yes	23	15	65.2 (45,7-84,7)	0,645
	No	6	3	50 (9,1-90)	
Zone	High Plains	15	11	73,3 (39,4-92,2)	0,371
	Saharan Atlas	8	4	50 (17,2-84,3)	
	Near Sahara	6	3	50 (13,9-88,2)	

Univariate analyses ( $\chi^2$  test for significance)

Horses that did not live near water points had a lower seroprevalence rate 31.8% (CI 95%, 18 – 45.6%) than those who did 49.62% (CI 95%, 41.1 – 58.1%). Similarly, horses that are not surrounded by dense vegetation had a lower seroprevalence 20% (CI 95%, 2.5 – 37.5%) than those who did 49.03% (CI 95%, 40.6 – 56.2%). Both environmental characteristics: water points (P=0.039) and vegetation (P=0.000000) were associated with seropositivity (P< 0.005).

The age of animals, horse breed and housing conditions were not statistically significantly associated

with seropositivity (p > 0.05).

Results of the multivariate logistic regression are summarized in table 3. Two risk factors were associated with *T.evansi* infection: sex and promiscuity with dromedaries (P<0.005). In this study, the risk of males for being seropositive was decreased by 67% than in females (P=0.006, OR=0.37, 95% CI= 0.17-0.74%). Horses living in promiscuity with dromedaries were 2.49 times more likely to be infected by *T.evansi* (P=0.013, OR=2.49, 95% CI= 1.23-5.25%).

**Table 3:** Factors influencing the risk of *Trypanosoma evansi* infection in horses (*Equus caballus*)

Risk factors	Category	Odds ratio	95% confidence interval (OR)	P-value
Gender	Male	0.37	0.17-0.74	0.006
	Female	Ref		
Age	≤ 5	Ref	0.68-2.69 0.07-0.95	0.386 0.054
	6 – 11	1.35		
	> 11	0.28		
Watering points	Yes	2.00	0.94-4.36	0.074
	No	Ref		
Promiscuity with Dromedaries	Yes	2.49	1.23-5.25	0.013
	No	Ref		

### Donkeys

No significant differences were found in the study of the influence of physical and environmental characteristics on the seroprevalence of donkeys' samples (Table 2).

### DISCUSSION

*Trypanosoma evansi* is the most widely distributed pathogenic salivarian trypanosome in animals. This parasite is cosmopolitan, affects a wide range of hosts (Desquesnes et al., 2013). In this paper, we have studied the prevalence of *T. evansi* parasites and antibodies in equines and the risk factors for surra in El-Bayadh district, southwestern Algeria.

A general weakness of this study is the fact that we were not able to microscopically observe the infecting parasite. The prevalence of parasites with the blood smear technique was 0%. This result is in agreement with a study on horses in Jordan (Abo-Shehada et al., 1999). Direct examination of the parasite in blood films usually fails in detecting the parasite if their concentration is less than  $2.5 \times 10^6$  parasites per ml of blood (Chappuis et al., 2005). The sensitivity of detecting parasites in stained blood smears is thus very low. Concentration techniques such as the micro-haematocrite centrifugation technique (MHCT) or the mini-anion-exchange centrifugation technique (MAECT) are recommended to increase the sensitivity of direct observation of the parasite (Tehseen et al., 2015). Alternatively, PCR is the most sensitive diagnostic tool for the molecular confirmation of *T. evansi* infection (Ramírez-Iglesias et al., 2011). PCR has been demonstrated to be a method of choice to detect infection by *T. evansi* in horses (Clausen et al., 2003); this technique was not available in our study.

To our knowledge, this study is the first report of the detection of *T. evansi* antibodies in equines in Algeria. The total CATT/*T. evansi* seroprevalence in equines in El-Bayadh district was 47.6% (CI 95%, 40.7-54.4%). The majority of the tested animals (56.1%) scored the lowest agglutination score (+). This result confirms that trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* is endemic in Algeria.

The seroprevalence obtained in horses alone was 45.2% (CI 95%, 37.8-52.5%), similar rates were found in Egypt and Jordan (Abo-Shehada et al., 1999; Zayed et al., 2010). Other publications reported higher seroprevalence rates, 73% were found in Brazil using IFAT (Herrera et al., 2004) and 92% were demonstrated in Philippine (Dargantes et al., 2009). Some studies report lower seroprevalence, as is the case in Malaysia (13%) (ELshafie et al., 2013) and India (27%) (Laha and Sasmal, 2008).

For donkeys, the seroprevalence was 62.1%. This rate is much higher than the seroprevalence reported in other countries; Egypt (44%) (Zayed et al., 2010) and India (11.53%) (Kumar et al., 2013).

The serological test used in this study, CATT/ *T. evansi* is a rapid and easy test to use but it cannot differentiate between past and present infection (Tehseen et al., 2015).

In this study, female horses are more exposed to the infection than males (P=0.006, OR=0.37, 95% CI= 0.17-0.74%). That result may be explained by the immunosuppression due to the gestation and to the difference of activities between females and males. This result agrees with some studies in horses, Elshafie et al (2013) were reported that female horses were 2.1 times more likely to be infected by *T. evansi*. In

contrast, a study in camels demonstrated that higher rates of male camels were infected with *T. evansi* than females (Njiru et al., 2004).

The seroprevalence of *T. evansi* varied in relation to the 3 agroclimatic zones. The highest rate was detected in the high plains zone ( $P=0.00001$ ). Here, Tabanids encounter favorable conditions (water, vegetation and woodland) that allow proliferation of these vectors.

Several studies have showed that the Tabanids in North Africa are implicated as the main vectors of *T. evansi* transmission (Baldacchino et al., 2014). Also, Animals that live near watering points ( $P=0.039$ ) and dense vegetation ( $P=0.000000$ ) are the most infected. Watering points and vegetation constitute a favorable environment to the survival of vectors.

The dromedaries' population in EL-Bayadh district is about 1450 heads (MADR, 2016). In this study, the contact of horses with dromedaries was considered to be a real risk factor, horses in contact with dromedaries were 2.49 times more likely to be positive for serology. Camels are known to reach high parasitemia in their blood, and therefore there mere proximity to horses in an area with vectors already likely increase risk for transmission. A study realized in El-Oued province, southeast Algeria, reported parasites in 14% of the Giemsa-stained blood smears of dromedaries (Bennoune et al., 2013).

No significant association was found between seropositivity and age, breed, housing and purpose of horses. Age was not significantly associated with the infection by *T. evansi* but horses aged between 6 and 11 years had higher rates of seroprevalance. A previous study revealed an augmentation of seropositivity to *T. evansi* in camels aged 5-11 years (Dia et al., 1997).

Horses that are living in individual boxes are less exposed to the infection by *T. evansi* because the contact with vectors and other sick animals is decreased. In this study, the breed and the purpose of horses were not significantly associated with the seropositivity. In

the contrary, a significant difference was been reported in Malaysia (Elshafie et al., 2013).

No physical or environmental characteristic was significantly associated in this study for donkeys. Donkeys are less susceptible to the infection by *Trypanosoma evansi* than horses (Desquesnes et al., 2013).

## CONCLUSION

This is the first study of seroprevalence of *T. evansi* in horses and donkeys in Algeria. It has shown that the seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in horses was 45.2% (CI 95%, 37.8-52.5%) and 62.1% (CI 95%, 44.4-79.7%) in donkeys. The results indicate that EL-Bayadh district is a highly endemic area. Gender, high plains zone, promiscuity with dromedaries, presence of animals near than watering points and vegetation are risk factors to be infected by *Trypanosoma evansi*. Other characteristics like breed, purpose and housing are not revealed as risk factors for the infection by trypanosomiosis. However, physicals and environmental characteristics were not significantly associated with the infection by *Trypanosoma evansi* in donkeys.

Despite this first detection of *Trypanosoma evansi* in equines, in Algeria, and the real risks that may be caused by its spread in many areas of the country, it's essential to increase the epidemiological surveillance of animals in infected and unaffected areas. Therefore, the scientific community and health authorities must pay attention to this parasite, which can be opportunities for new developments in its geographical distribution, especially to the North.

## CONFLICT OF INTEREST

None declared.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the ministry of Higher Education and Scientific Research in Algeria and carried out within the High National Veterinary School of Algiers.

We gratefully thank all those who contributed to the realization of this work.

## REFERENCES

- Abo-Shehada MN, Anshassi H, Mustafa G, Amr Z (1999) Prevalence of Surra among camels and horses in Jordan. *Prev Vet Med* 38:289–293.
- Baldacchino F, Desquesnes M, Mihok S, Foil LD, Duvallet G, Jitapalpong S (2014) Tabanids: Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents! *Infect Genet Evol* 28:596–615.
- Bennoune O, Adili N, Amri K, Benneceb L, Ayachi A (2013) Trypanosomiasis of camels (*Camelus dromedarius*) in Algeria: First report In: *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*, p 273. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Birhanu H, Rogé S, Simon T, Baelmans R, Gebrehiwot T, Goddeeris BM, Büscher P (2015) Surra Sero K-SeT, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in domestic animals. *Vet Parasitol* 211:153–157.
- Brun R, Hecker H, Lun Z-R (1998) *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet Parasitol* 79:95–107.
- Chappuis F, Loutan L, Simarro P, Lejon V, Buscher P (2005) Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 18:133–146.
- Claes F, Ilgekbayeva GD, Verloo D, Saidouldin TS, Geerts S, Buscher P, Goddeeris BM (2005) Comparison of serological tests for equine trypanosomiasis in naturally infected horses from Kazakhstan. *Vet Parasitol* 131:221–225.
- Clausen P-H, Chuluun S, Sodnomdarjaa R, Greiner M, Noeckler K, Staak C, Zessin K-H, Schein E (2003) A field study to estimate the prevalence of *Trypanosoma equiperdum* in Mongolian horses. *Vet Parasitol* 115:9–18.
- Dargantes AP, Mercado RT, Dobson RJ, Reid SA (2009) Estimating the impact of *Trypanosoma evansi* infection (surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. *Int J Parasitol* 39:1109–1114.
- Desquesnes M, Dargantes A, Lai D-H, Lun Z-R, Holzmüller P, Jitapalpong 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.
- Dia ML, Diop C, Aminetou M, Jacquiet P, Thiam A (1997) Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* in camels in Mauritania. *Vet Parasitol* 72:111–120.
- Elshafie EI, Sani RA, Hassan L, Sharma R, Bashir A, Abubakar IA (2013) Seroprevalence and risk factors of *Trypanosoma evansi* infection in horses in Peninsular Malaysia. *Res Vet Sci* 94:285–289.
- Evans, G. (1880) Report on “surra” disease in the Dera Ismail Khan district, *Punjab Gov. Mil. Dep* 493-446.
- Evans, G. (1881) On a Horse Disease in India Known as “Surra,” Probably Due to a Hæmatozoon. *Vet. J. Ann. Comp. Pathol* 13:180–200.
- Fernández D, González-Baradat B, Eleizalde M, González-Marcano E, Perrone T, Mendoza M (2009) *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Exp Parasitol* 121:1–7.
- Fikru R, Andualem Y, Getachew T, Menten J, Hasker E, Merga B, Goddeeris BM, Büscher P (2015) Trypanosome infection in dromedary camels in Eastern Ethiopia: Prevalence, relative performance of diagnostic tools and host related risk factors. *Vet Parasitol* 211:175–181.
- Gardiner PR, Mahmoud MM (1992) *Salivarian trypanosomes producing disease in livestock outside sub-Saharan Africa* (Report). Academic Press.
- Hariy FM, El-Metwally MT, Khalil HH, Morsy TA (2011) *Trypanosoma evansi* in dromedary camel: with a case report of zoonosis in greater Cairo, Egypt. *J Egypt Soc Parasitol* 41:65–76.
- Hasan MU, Muhammad G, Gutierrez C, Iqbal Z, Shakoor A, Jabbar A (2006) Prevalence of *Trypanosoma evansi* Infection in Equines and Camels in the Punjab Region, Pakistan. *Ann N Y Acad Sci* 1081:322–324.
- Herrera HM, Dávila AMR, Norek A, Abreu UG, Souza SS, D’Andrea PS, Jansen AM (2004) Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet Parasitol* 125:263–275.
- Hilali M, Abdel-Gawad A, Nassar A, Abdel-Wahab A, Magnus E, Büscher P (2004) Evaluation of the card agglutination test (CATT/T. evansi) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Vet Parasitol* 121:45–51.
- Hoare CA (1965) Vampire Bats as Vectors and Hosts of Equine and Bovine Trypanosomes. *Acta Trop* 22:204–16.
- Joshi PP, Shegokar VR, Powar RM, Herder S, Katti R, Salkar HR, Dani VS, Bhargava A, Jannin J, Truc P (2005) Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am J Trop Med Hyg* 73:491–495.
- Kumar R, Kumar S, Khurana SK, Yadav SC (2013) Development of an antibody-ELISA for seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in equids of North and North-western regions of India. *Vet Parasitol* 196:251–257.
- Laha R, Sasmal NK (2008) Endemic status of *Trypanosoma evansi* infection in a horse stable of eastern region of India – a field investigation. *Trop Anim Health Prod* 40:357–361.
- Luckins AG (1988) *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol Today* 4:137–142.
- MADR.: Ministry of Agriculture, Rural Development and Fisheries., 2016.
- Mahmoud MM, Gray AR (1980) Trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* (steel, 1885) balbiani, 1888. a review of recent research. *Trop Anim Health Prod* 12:35–47.
- Njiru ZK, Constantine CC, Ndung’u JM, Robertson I, Okaye S, Thompson RCA, Reid SA (2004) Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. evansi tests in Kenya. *Vet Parasitol* 124:187–199.
- Powar R, Shegokar V, Joshi P, Dani V, Tankhiwale N, Truc P, Jannin J, Bhargava A (2006) A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma Evansi*. *Indian J Med Microbiol* 24:72.
- Ramirez-Iglesias JR, Eleizalde MC, Gómez-Piñeres E, Mendoza M (2011) *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomiasis using rabbit as an experimental model. *Exp Parasitol* 128:91–96.
- Rodrigues A, Figuera RA, Souza TM, Schild AL, Barros CSL (2009) Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. *Vet Pathol* 46:251–258.
- Tamarit A, Gutierrez C, Arroyo R, Jimenez V, Zagalá G, Bosch I, Sirvent J, Alberola J, Alonso I, Caballero C (2010) *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. *Vet Parasitol* 167:74–76.
- Tehseen S, Jahan N, Qamar MF, Desquesnes M, Shahzad MI, Deborggraeve S, Büscher P (2015) Parasitological, serological

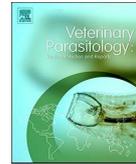
- and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasit Vectors* 8.
- Tuntasuvan D, Jarabrum W, Viseshakul N, Mohkaew K, Borisutsuwan S, Theeraphan A, Kongkanjana N (2003) Chemotherapy of surra in horses and mules with diminazene aceturate. *Vet Parasitol* 110:227–233.
- Van Vinh Chau N, Buu Chau L, Desquesnes M, Herder S, Phu Huong Lan N, Campbell JI, Van Cuong N, Yimming B, Chalermwong P, Jittapalpong S, Ramon Franco J, Tri Tue N, Rabaa MA, Carrique-Mas J, Pham Thi Thanh T, Tran Vu Thieu N, Berto A, Thi Hoa N, Van Minh Hoang N, Canh Tu N, Khac Chuyen N, Wills B, Tinh Hien T, Thwaites GE, Yacoub S, Baker S (2016) A Clinical and Epidemiological Investigation of the First Reported Human Infection With the Zoonotic Parasite *Trypanosoma evansi* in Southeast Asia. *Clin Infect Dis* 62:1002–1008.
- Zayed AA, Habeeb SM, Allam N a. T, Ashry HMZ, Mohamed AHH, Ashour AA, Taha HA (2010) A critical comparative study of parasitological and serological differential diagnostic methods of *Trypanosoma evansi* infections in some farm animals in Egypt. *Am-Eurasian J Agric Environ Sci* 8:633–642.

**Chapitre 4: Assessment of *Trypanosoma evansi* prevalence and associated risk factors by immune trypanolysis test in camels from Ghardaïa district, South Algeria.**



Contents lists available at ScienceDirect

# Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/vprsr](http://www.elsevier.com/locate/vprsr)

Original Article

## Assessment of *Trypanosoma evansi* prevalence and associated risk factors by immune trypanolysis test in camels from Ghardaïa district, southern Algeria

Karima Benfodil<sup>a,b,\*</sup>, Philippe Büscher<sup>c</sup>, Samir Ansel<sup>a</sup>, Abdellah Mohamed Cherif<sup>a</sup>,  
Amine Abdelli<sup>b</sup>, Nick Van Reet<sup>c</sup>, Said Fettata<sup>d</sup>, Nicolas Bebronne<sup>c</sup>, Sara Dehou<sup>c</sup>, Manon Geerts<sup>c</sup>,  
Fatima Balharbi<sup>c</sup>, Riad Bouzid<sup>a</sup>, Khatima Ait-Oudhia<sup>a</sup>

<sup>a</sup> High National Veterinary School of Algiers, Issad Street, Oued Smar, Bab Ezzouar, Algeria

<sup>b</sup> Akli Mohand Oulhadj University, Department of Agriculture Science, Drissi Yahia Street, Bouira, Algeria

<sup>c</sup> Institute of Tropical Medicine, Department of Biomedical Sciences, Nationalestraat 155, 2000 Antwerp, Belgium

<sup>d</sup> Veterinary Practice, Thnia Street, Ghardaïa, Algeria



### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Trypanosoma evansi*  
Immune trypanolysis  
Seroprevalence  
Camels  
Risk factors  
Algeria

### ABSTRACT

*Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) is a flagellated parasite with worldwide distribution, mainly affecting camels, horses, dogs, buffaloes and wild animals. Trypanosomosis caused by *T. evansi*, known as surra, is a vector borne disease that affects the health and productivity of camels. The aim of our study was to assess the prevalence of trypanosomosis due to *T. evansi* in camels by the immune trypanolysis test and to identify associated risk factors. Our cross-sectional study was performed on 161 camels from Ghardaïa district, southern Algeria. A structured questionnaire was used to collect data on individual characteristics (age, gender and breed) husbandry management (herd size and activity of animals) and health conditions (history of abortion and clinical symptoms).

The immune trypanolysis test revealed an overall seroprevalence of 9.3% (CI 95%, 5.9–14.9). Possible factors associated with *T. evansi* infection were analysed by univariate and multivariate logistic regression. The results showed that risk factors for camels were history of symptoms ( $P = 0.002$ , OR = 21.91, CI95% = 3.48–169.80), racing activities ( $P = 0.003$ , OR = 0.01, CI95% = 0.001–0.18) and small herd size ( $P = 0.013$ , OR = 8.22, CI95% = 1.64–49.75). In conclusion, this study showed that *T. evansi* is endemic in camels of Ghardaïa district. To reduce dissemination of the disease to non-endemic areas, it is recommended to minimise risk factors associated with the infection.

### 1. Introduction

*Trypanosoma evansi* is the first trypanosome identified in 1885 as a mammalian pathogen by Griffith Evans in horses and camels in India and more investigations were reported by Edouard-Gérard Balbiani in 1888 (Desquesnes et al., 2013b). *Trypanosoma evansi* infection in camels is known as surra and is called debbab in North Africa. *T. evansi* is a flagellated protozoan of intra- and extra vascular fluids. It is transmitted mechanically by insect vectors such as *Tabanus spp.* and *Stomoxys spp.* (Brun et al., 1998; Luckins, 1988) and by vampire bats (*Desmodus rotundus*) in South America (Desquesnes et al., 2013a). *Trypanosoma evansi* infection (surra) is a major enzootic disease of the dromedary camel (Dia et al., 1997; Abo-Shehada et al., 1999; Atarhouch et al., 2003; Njiru et al., 2004; Birhanu et al., 2015a; Fikru et al., 2015; Tehseen et al., 2015; Alanazi et al., 2018; Boushaki et al., 2019), but is also identified in many domestic and wild animals

(Benfodil et al., 2019; Elshafie et al., 2013; Herrera et al., 2004; Jaimes-Dueñez et al., 2017; Laha and Sasmal, 2009; Ramírez-Iglesias et al., 2017; Rjeibi et al., 2015). The disease has been reported in many countries with prevalences in camels ranging from 1% to 56% (Aregawi et al., 2019). Clinical signs may suggest surra, but the infection can only be confirmed by laboratory tests. Parasitological examinations are usually carried out by microscopic observation of a drop of blood spread on a slide or of cerebrospinal fluid (in the case of nervous signs) (Desquesnes et al., 2013b). Serological tests are very useful or even essential in the case of trypanosomosis. As serological techniques, the Terrestrial Manual of the World Organisation for Animal Health (OIE) lists several serological techniques: An ELISA with purified *T. evansi* antigen (ELISA/RoTat 1.2), an ELISA with whole cell lysate antigen (ELISA/WCL), the Card Agglutination Test for *T. evansi* (CAT/T. *evansi*) and the immune trypanolysis (TL) which is an antibody-mediated complement lysis test with *T. evansi* variable antigen type (VAT)

\* Corresponding author at: High National Veterinary School of Algiers, Issad Street, Oued Smar, Bab Ezzouar, Algeria.

E-mail address: [karimaensv@gmail.com](mailto:karimaensv@gmail.com) (K. Benfodil).

<https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100460>

Received 12 March 2020; Received in revised form 15 August 2020; Accepted 2 September 2020

Available online 04 September 2020

2405-9390/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

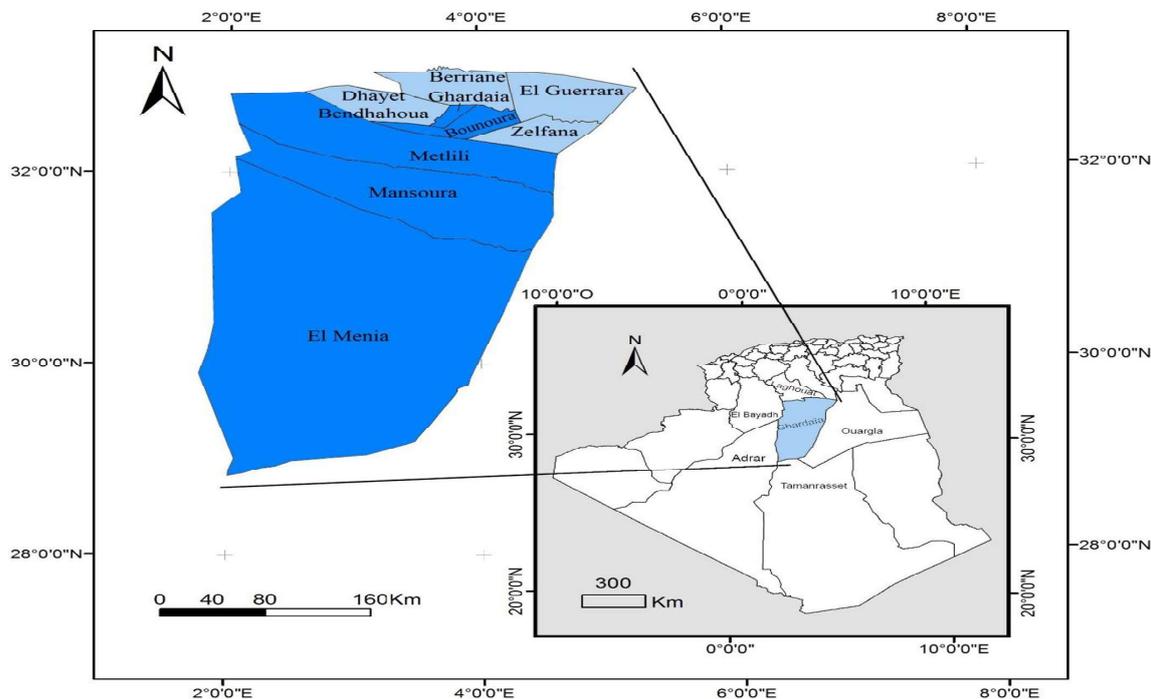


Fig. 1. Map of the wilaya of Ghardaïa showing geographical location (daïras) of the study.

RoTat 1.2 (OIE, 2008). For molecular diagnosis, TBR PCR, which targets a Trypanozoon-specific 177 bp repetitive microsatellite sequence is recommended (Masiga et al., 1992; OIE, 2008). In the developing world, surra is ranked among the twenty diseases with the greatest impact (Perry, 2002). Regarding Africa, little work has been done on quantification of economic losses due to surra. The status of *T. evansi* in Algeria is not well known, few studies have been carried out on the epidemiology of *T. evansi* in dromedaries (Bennoune et al., 2013; Boushaki et al., 2019). The objective of our study was to assess the prevalence of *T. evansi* in dromedaries in the district of Ghardaïa using a reference serological test and to investigate some risk factors.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study design and sample collection

The present study was conducted in five boroughs or daïras (Ghardaïa, Bounoura, Metlili, Mansoura and Menea) of the district (wilaya) of Ghardaïa, southern Algeria (Fig. 1). The wilaya of Ghardaïa covers a total area of 86,560 km<sup>2</sup> in the Algerian Sahara Desert, between 33° and 31°15' N – 2°30' and 5° East. The study was carried out on 161 dromedaries randomly selected from May 2017 to January 2018. Blood samples were collected from the jugular vein in 7 ml sterile tubes. Sera were obtained by centrifugation for 10 min at 3000 rpm and subsequently stored at –20 °C until serological analysis.

### 2.2. Questionnaire

A standardised questionnaire was filled out for each animal at the time of sampling. The questionnaire included data on the individual animal: age, gender and breed. On the other hand, information on husbandry management (herd size, husbandry system and activity of animals) were collected as well. Data about clinical signs related to

trypanosomiasis (anemia, icterus, oedema, weight loss) and abortion were also obtained.

### 2.3. Immune trypanolysis

Immune trypanolysis, an antibody mediated complement lysis test, was performed as have been described in previous studies (Van Meirvenne et al., 1995; Verloo et al., 2001). In short, trypanosomes of the *T. evansi* RoTat 1.2 clone were harvested from an infected mouse and diluted in guinea pig serum. From this suspension, fifty microliters were dispensed in the wells of a microtiter plate where after 50 µl of test serum, 1:2 diluted in guinea pig serum, were added. Subsequently, the microtiter plate was shaken for a few seconds and incubated at ambient temperature. After 90 min, 5 µl of the mixture were deposited on a microscope slide, covered with an 18 × 18 mm cover slip and examined under a phase contrast microscope at 25 × 10 magnifications. The test sample were considered positive if ≥ 50% of the trypanosomes were lysed (Fig. 2, panel A) and negative if < 50% of the trypanosomes were lysed (Fig. 2, panel B).

### 2.4. Data analysis

Statistical analyses were performed using packages and functions in R Studio (version 1.1.383, RStudio Inc., Boston, MA). Explanatory variables were categorised as appropriate: age (≤ 5, 6–11, > 11), gender (male, female), breed (sahraoui, tergui), history of symptoms (yes, no), history of abortion (yes, no), husbandry system (extensive, semi intensive, intensive); herd size [small (< 50), large (≥ 50)]; activity of animals (racing, production), geographic location (Ghardaïa, Bounoura, Metlili, Mansoura, El Ménéa).

Associations between the animals' status in a serological test and the other independent variables were assessed using univariable and multivariable logistic regression based on the Generalized Linear Models

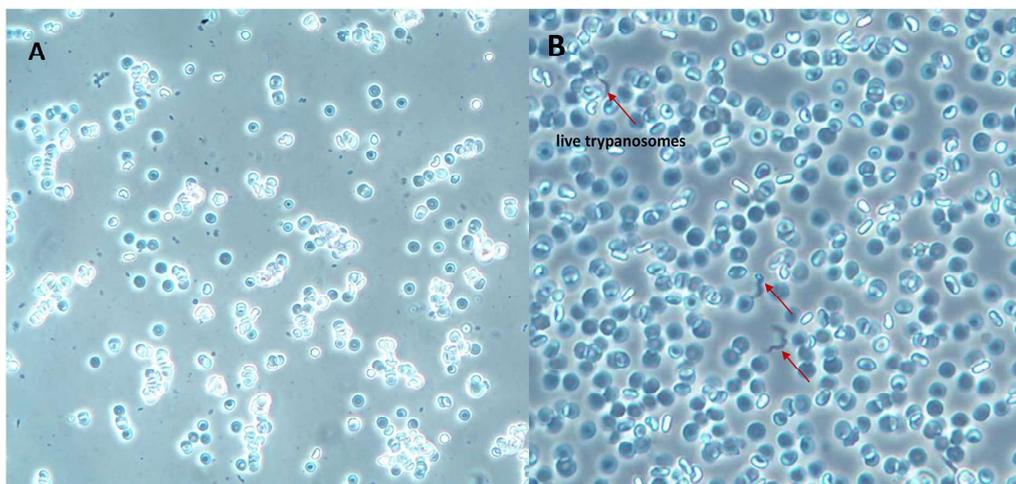


Fig. 2. Results of the immune trypanolysis test. Panel A: 100% lysis of trypanosomes. Panel B: 0% lysis of trypanosomes. Arrows point to intact trypanosomes.

(GLM). Univariate regression analysis of fixed factors on *T. evansi* seropositivity was carried out to determine those factors that explained most variation in *T. evansi* seropositivity from the complete data set. A backwards stepwise approach was used to find the best fitting model to describe the dataset (Dohoo et al., 2009). Based on the Akaike's information criterion (AIC), it was decided whether the other factors improved the model fit. A *p*-value of  $\leq 0.05$  was considered significant.

### 2.5. Ethics

All animal owners gave their oral consent before collection of samples and data. All farms data were analysed with confidentiality. Camels included in the study were sampled by experienced veterinarians taking into account all applicable guidelines for the care and use of animals. The protocol for the culture of trypanosomes in mice was approved by the Veterinary Ethics Committee of the Institute of Tropical Medicine Antwerp, Belgium (DPU2017-1).

## 3. Results

### 3.1. Seroprevalence of *Trypanosoma evansi*

Among the 161 dromedaries tested, 15 (9.3%, CI95%, 5.9–14.9%) were positive for *T. evansi*. The seroprevalence was variable between different daïras included in the study, but was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). The highest seroprevalence was observed in Ghardaïa 15.4% (CI 95%, 4.7–45.5%).

### 3.2. Univariate analysis

The results of the risk factor study through univariate analysis are summarised in Table 1. The activity of animals and the herd size were associated with *T. evansi* seroprevalence ( $p < 0.05$ ).

### 3.3. Multivariate analysis

The results of the multivariate logistic regression are summarised in Table 2. Among the analysed factors, a significant association in the multivariate analysis was observed for the variables: history of symptoms, activity of animals and herd size. Regarding history of symptoms, it was found that animals presenting symptoms like anemia and weight loss were 22 times more likely to be seropositive than animals without

Table 1

Univariable analysis of risk factors associated with *T. evansi* seroprevalence among dromedaries.

Risk factors	Category	No	Positive no	Seroprevalence % (95% CI)	p-Value
Age	$\leq 5$	58	9	15.5 (8.7–27.4)	0.124
	6–11	63	4	6.3 (2.8–15.5)	
	$> 11$	40	2	5 (1.7–11.7)	
Gender	Male	43	6	14 (6.9–2.8)	0.222
	Female	118	9	7.6 (4.3–14)	
Breed	Sahraoui	124	13	10.5 (6.5–17.3)	0.351
	Tergui	37	2	5.4 (1.8–18.2)	
History of symptoms	Yes	92	9	10.8 (5.5–17.6)	0.814
	No	69	6	8.7 (4.4–17.8)	
History of abortion	Yes	83	5	9.6 (5.4–17.4)	0.138
	No	78	10	12.8 (7.4–22.3)	
Husbandry system	Extensive	57	2	3.5 (1.2–12.1)	0.168
	Semi intensive	82	10	13.6 (5.2–34.9)	
	Intensive	22	3	12.2 (7.1–21.3)	
Herd size (head)	Large ( $\geq 50$ )	84	3	3.9 (1.6–11.1)	0.009
	Small ( $< 50$ )	77	12	21.1 (12.7–3.4)	
Activity of animals	Racing	6	3	50 (13.9–88.2)	$< 0.001$
	Production	155	12	7.7 (7.4–13.1)	
Geographic location (daïra)	Ghardaïa	13	2	15.4 (4.7–45.5)	0.303
	Bounoura	19	2	10.5 (3.4–33.1)	
	Merlili	55	8	14.5 (7.9–26.7)	
	Mansoura	55	2	3.6 (1.3–12.5)	
	El Ménéa	19	1	5.3 (1.3–26)	

Univariate analyses ( $\chi^2$  test for significance).

such symptoms ( $P = 0.002$ , OR = 21.91, CI95% = 3.48–169.80). Dromedaries bred for production (milk, meat) have 99% less chance to be infected with *T. evansi*, than animals used for racing ( $P = 0.003$ , OR = 0.01, CI95% = 0.001–0.18). It was found that animals living in small herd size were 8.2 times more likely to be infected by *T. evansi* ( $P = 0.013$ , OR = 8.22, CI95% = 1.64–49.75).

## 4. Discussion

In this study, 9.3% of camels were found positive for surra. The estimated seroprevalence of this infection was similar to the seroprevalence of 11.4% found by Boushaki et al. (2019) in the wilaya of Ouargla, southern Algeria, but lower than those reported in other studies. For example, Tehseen and co-workers reported 39.9% seroprevalence in the Cholistan Desert of Pakistan (Tehseen et al., 2015)

**Table 2**  
Multivariate logistic regression analysis of factors influencing the risk of *Trypanosoma evansi* seropositivity in dromedaries.

Risk factors	Category	Odds ratio	95% confidence interval	p-Value
Age	≤ 5	8.36	1.00–198.64	0.089
	6–11	4.05	0.46–94.40	0.263
	> 11	Ref	Ref	
History of symptoms	Yes	21.91	3.48–169.80	0.002
	No	Ref	Ref	
History of abortion	Yes	0.37	0.06–2.03	0.252
	No	Ref	Ref	
Activity	Production	0.01	0.001–0.18	0.003
	Racing	Ref	Ref	
Herd size	Small (< 50)	8.22	1.64–49.75	0.013
	Large (≥ 50)	Ref	Ref	

and Boushaki and co-workers reported 32.6% and 70.1% in the wilayates of Bechar and El-Baydh in south Algeria (Boushaki et al., 2019). The low seropositivity demonstrated in our study may be due to the fact that *T. evansi* infection is known by camel owners and veterinarians of the region. Camel owners avoid areas where surra is endemic and where vectors are abundant and diseased animals are treated with trypanocides like: melarsomine, Cymelarsan®, marketed by Merial. Compared to the 2–6% seroprevalence observed in Ethiopia by Birhanu et al. (2015a), the seroprevalence in our study was somewhat higher. All cited studies used the immune trypanolysis test that is considered the most specific test for the diagnosis of *T. evansi* (Holland et al., 2002). The disadvantages of immune trypanolysis are its high cost and the need for a well-equipped laboratory. An alternative to the immune trypanolysis test such as a field applicable immunochromatographic test would be most welcome (Birhanu et al., 2015b). Unfortunately, due to market failure, no single one is commercially available anymore.

All daïras included in this study are affected by *T. evansi*, but no significant difference in seroprevalence was observed. The highest prevalence was observed in the daïra of Ghardaïa (15.4%) followed by Metlili (14.5%) and Mansoura (3.6%). This variation of *T. evansi* seroprevalence in different countries and between the daïras of the same wilaya can be due to the abundance of vectors, difference of husbandry systems and applied epidemiological surveillance and control measures.

Small herd size is considered a major risk factor in this study. Camels living in small herds were 8.2 times more likely to be positive for serology. In Algeria, small herds are found on farms managed traditionally, which promote very close contact between animals and vectors. This study showed a significant association between activity of camels and seropositivity to *T. evansi*. Camels used for racing were more infected than camels used for production. Camel races are traditional events where large numbers of camels from different regions are gathered, thus increasing the risk of dissemination of *T. evansi* if the vectors are present. In contrast with other studies reporting higher prevalence rates in older (> 5 years) dromedary camels (Dia et al., 1997; Atarhouch et al., 2003; Fikru et al., 2015), the age of animals was not significantly associated with seropositivity in our study. We observed that animals presenting clinical signs like anemia; weight loss and diarrhea have approximately 22.0 times more chance to be seropositive for *T. evansi* than animals without clinical signs. These clinical signs can be due to the infection by *T. evansi*. After 8 days of intermitted fever, camels affected by *T. evansi* express the following symptoms: anemia, weight loss and oedema (Singh and Momin, 2008). Also poor body condition due to malnutrition or other infections increases the susceptibility of camels to *T. evansi* infection (Swai et al., 2011). Although seropositivity rate in females (14%) was higher than in males (7.6%), no significant association with gender was observed. This result is in line with the study of Ngaira et al. (2004). Other studies reported that females were significantly more infected than males (Dia et al., 1997; Tehseen et al., 2015). Immunosuppression related to the periods

of gestation and lactation might increase the susceptibility to infection with *T. evansi* although another study conducted in Kenya demonstrated that males were 2.6 times more likely to be infected than females (Njiru et al., 2004). Regarding the husbandry system, no significant difference was showed. This result is in contrast with studies that identified extensive system as a risk factor for *T. evansi* in camels in Mauritania and Kenya (Dia et al., 1997; Ngaira et al., 2004). In these African countries, contrary to Algeria, nomadism is the dominant husbandry system and relies on an extensive farming system. It is based on migration during dry seasons in order to search for water points and vegetation which is an environment favorable to the proliferation of vectors (Delafosse and Doutoum, 2004; Dia et al., 1997). The breed of camels was not identified as a risk factor in our study which corresponds with another study conducted in Pakistan (Tehseen et al., 2015). In contrast, a study in Saudi Arabia reported that breeds with light coat are more infected than breeds with dark color (Elwathig et al., 2016). We failed to show a significantly different seropositivity of camels with a history of abortion. Although abortion is a potential sign of *T. evansi* infection in camels, it can be due to different pathogens. Two studies reported other pathogens causing abortion in camels in the wilaya of Ghardaïa: *Coxiella burnetii* with a seroprevalence of 74% (Benaïssa et al., 2017) and *Toxoplasma gondii* with a seroprevalence of 9.8% (Mohamed-Cherif, 2019).

We conclude that dromedary camels of the wilaya of Ghardaïa, as several other wilayas of southern Algeria, are exposed to infection with *T. evansi*. Data about risk factors associated to the infection may serve to elaborate programs to prevent and control the dissemination of *T. evansi* in Algeria.

#### Ethical statements

All animal owners gave their oral consent before collection of samples and data. All farms data were analysed with confidentiality. Camels included in the study were sampled by experienced veterinarians taking into account all applicable guidelines for the care and use of animals. The protocol for the culture of trypanosomes in mice was approved by the Veterinary Ethics Committee of the Institute of Tropical Medicine Antwerp, Belgium (DPU2017-1).

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Acknowledgements

Thanks are due to the OIE Reference Laboratory for Surra for allowing us to carry out the diagnostic tests at the Institute of Tropical Medicine in Antwerp and the High National Veterinary School of Algiers, Algeria for funding the stay of KB in Belgium. Thanks are also due to veterinarians of the agriculture service of the wilaya of Ghardaïa for their help in collecting samples. We thank all owners for field assistance. We also thank Dr. Benbouras Mohamed Amin of High national polytechnic School of Algiers for realizing the geographical maps. We thank Dr. Meryam Krit of the Institute of Tropical Medicine Antwerp for helping in data interpretation.

#### References

- Abo-Shehadeh, M.N., Anshassi, H., Mustafa, G., Amr, Z., 1999. Prevalence of Surra among camels and horses in Jordan. *Prev. Vet. Med.* 38, 289–293.
- Alanazi, A.D., Puschendorf, R., Salim, B., Alyousif, M.S., Alanazi, I.O., Al-shehri, H.R., 2018. Molecular detection of equine trypanosomiasis in the Riyadh province of Saudi Arabia. *J. Vet. Diagn. Investig.* 30, 942–945. <https://doi.org/10.1177/1040638718798688>.
- Aregawi, W.G., Agga, G.E., Abdi, R.D., Büscher, P., 2019. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasit. Vectors* 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>.

- Atarhouch, T., Rami, M., Bendahman, M.N., Dakkak, A., 2003. Camel trypanosomosis in Morocco: results of a first epidemiological survey. *Vet. Parasitol.* 111, 277–286. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00382-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00382-5).
- Benaissa, M.H., Ansel, S., Mohamed-Cherif, A., Benfodil, K., Khelef, D., Youngs, C.R., Kaidi, R., Ait-Oudhia, K., 2017. Seroprevalence and risk factors for *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) population in Algeria. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 84. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v84i1.1461>.
- Benfodil, K., Ansel, S., Mohamed-Cherif, A., Ait-Oudhia, K., 2019. Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* 70, 1631–1638. <https://doi.org/10.12681/jhvms.21786>.
- Bennoune, O., Adili, N., Amri, K., Bennecib, L., Ayachi, A., 2013. Trypanosomiasis of camels (*Camelus dromedarius*) in Algeria: first report. In: *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, pp. 273.
- Birhanu, H., Fikru, R., Saïd, M., Kidane, W., Gebrehiwot, T., Hagos, A., Alemu, T., Dawit, T., Berkvens, D., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2015a. Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, Northern Ethiopia. *Parasit. Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0818-1>.
- Birhanu, H., Rogé, S., Simon, T., Baelmans, R., Gebrehiwot, T., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2015b. Surra Sero K-SeT, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in domestic animals. *Vet. Parasitol.* 211, 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.008>.
- Boushaki, D., Adel, A., Dia, M.L., Büscher, P., Madani, H., Brihoum, B.A., Sadaoui, H., Bouayed, N., Kechemir Issad, N., 2019. Epidemiological investigations on *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the South of Algeria. *Heliyon* 5, e02086. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02086>.
- Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.-R., 1998. *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.* 79, 95–107. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00146-0).
- Delafosse, A., Doutoum, A.A., 2004. Prevalence of *Trypanosoma evansi* infection and associated risk factors in camels in eastern Chad. *Vet. Parasitol.* 119, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.010>.
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D.-H., Lun, Z.-R., Holzmüller, P., Jittapalpong, S., 2013a. *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2013/321237>.
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R., Jittapalpong, S., 2013b. *Trypanosoma evansi* and Surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed. Res. Int.* 2013, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>.
- Dia, M.L., Diop, C., Aminetou, M., Jacquet, P., Thiam, A., 1997. Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* in camels in Mauritania. *Vet. Parasitol.* 72, 111–120. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00054-X).
- Dohoo, I., Martin, W., Stryhn, H., 2009. *Veterinary Epidemiologic Research*, 2nd ed. VER Inc, Charlottetown.
- Elshafie, E.I., Sani, R.A., Hassan, L., Sharma, R., Bashir, A., Abubakar, I.A., 2013. Seroprevalence and risk factors of *Trypanosoma evansi* infection in horses in Peninsular Malaysia. *Res. Vet. Sci.* 94, 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.004>.
- Elwathig, M., Faye, B., Thevenon, S., Ravel, S., Bossard, G., 2016. Epidemiological surveys of camel trypanosomosis in Al-Jouf, Saudi Arabia based on PCR and ELISA. *Emir. J. Food Agric.* 212–216. <https://doi.org/10.9755/efja.2015-09-759>.
- Fikru, R., Andualem, Y., Getachew, T., Menten, J., Hasker, E., Merga, B., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2015. Trypanosome infection in dromedary camels in eastern Ethiopia: prevalence, relative performance of diagnostic tools and host related risk factors. *Vet. Parasitol.* 211, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.008>.
- Herrera, H.M., Dávila, A.M.R., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet. Parasitol.* 125, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.013>.
- Holland, W.G., Thanh, N.G., My, L.N., Magnus, E., Verloof, D., Büscher, P., Goddeeris, B., Vercurryse, J., 2002. Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper discs in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Trop.* 81, 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00211-X).
- Jaimes-Duñez, J., Triana-Chávez, O., Valencia-Hernández, A., Sánchez-Arévalo, D., Poche-Ceballos, A., Ortiz-Álvarez, J., Mejía-Jaramillo, A.M., 2017. Molecular diagnosis and phylogeographic analysis of *Trypanosoma evansi* in dogs (*Canis lupus familiaris*) suggest an epidemiological importance of this species in Colombia. *Prev. Vet. Med.* 139, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.007>.
- Laha, R., Sasmal, N.K., 2009. Detection of *Trypanosoma evansi* infection in clinically ill cattle, buffaloes and horses using various diagnostic tests. *Epidemiol. Infect.* 137, 1583. <https://doi.org/10.1017/S095026880900260X>.
- Luckins, A.G., 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today* 4, 137–142. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90188-3).
- 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. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90047-0](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90047-0).
- Mohamed-Cherif, A., 2019. Toxoplasmosse animale en Algérie: étude épidémiologique chez diverses espèces animales et évaluation du risque zoonotique lié à *Toxoplasma gondii* sur la santé. unpublished PhD thesis. High National Veterinary School of Algiers.
- Ngaira, J.M., Njagi, E.N.M., Ngeranwa, J.J.N., Olembo, N.K., 2004. PCR amplification of RoTat 1.2 VSG gene in *Trypanosoma evansi* isolates in Kenya. *Vet. Parasitol.* 120, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.007>.
- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Ndung'u, J.M., Robertson, I., Okaye, S., Thompson, R.C.A., Reid, S.A., 2004. Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. *evansi* tests in Kenya. *Vet. Parasitol.* 124, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.029>.
- OIE (World Organisation for Animal Health), 2008. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*, 6 ed. OIE, Paris.
- Perry, B.D., 2002. Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty. ILRI (aka ILCA and ILRAD).
- Ramírez-Iglesias, J.R., Eleizalde, M.C., Reyna-Bello, A., Mendoza, M., 2017. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *J. Parasit. Dis. Off. Organ Indian Soc. Parasitol.* 41, 450–458. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0826-x>.
- Rjeibi, M.R., Ben Hamida, T., Dalgatova, Z., Mahjoub, T., Rejeb, A., Dridi, W., Gharbi, M., 2015. First report of Surra (*Trypanosoma evansi* infection) in a Tunisian dog. *Parasite* 22, 3. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015004>.
- Singh, V., Momin, R.R., 2008. Common parasitic diseases of camel. *Vet. World* 1, 317.
- Swai, E.S., Moshy, W., Mbise, E., Kaaya, J., Bwanga, S., 2011. First field investigation report on the prevalence of trypanosomosis in camels in northern Tanzania. *Res. Opin. Anim. Vet. Sci.* 1, 15–18.
- Tehseen, S., Jahan, N., Qamar, M.F., Desquesnes, M., Shahzad, M.I., Deborggraeve, S., Büscher, P., 2015. Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasit. Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1002-3>.
- Van Meirvenne, N., Magnus, E., Büscher, P., 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.* 60, 189–199. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(95\)00127-z](https://doi.org/10.1016/0001-706x(95)00127-z).
- Verloof, D., Magnus, E., Büscher, P., 2001. General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Vet. Parasitol.* 97, 185–191. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00412-5).

**Chapitre 5: Comparison of serological  
and molecular tests for detection of  
*Trypanosoma evansi* in domestic animals  
from Ghardaïa district, South Algeria**



## Research paper

## Comparison of serological and molecular tests for detection of *Trypanosoma evansi* in domestic animals from Ghardaïa district, South Algeria



Karima Benfodil<sup>a,b,\*</sup>, Philippe Büscher<sup>c</sup>, Amine Abdelli<sup>b</sup>, Nick Van Reet<sup>c</sup>,  
Abdellah Mohamed-herif<sup>a</sup>, Samir Ansel<sup>a</sup>, Said Fettata<sup>d</sup>, Sara Dehou<sup>c</sup>, Nicolas Bebronne<sup>c</sup>,  
Manon Geerts<sup>c</sup>, Fatima Balharbi<sup>c</sup>, Khatima Ait-Oudhia<sup>a</sup>

<sup>a</sup> High National Veterinary School of Algiers, Issad Street, Oued Smar, Bab Ezzouar, Algeria

<sup>b</sup> Akli Mohand Oulhadj University, Department of Agriculture Science, Drissi Yahia Street, Bouira, Algeria

<sup>c</sup> Institute of Tropical Medicine, Department of Biomedical Sciences, Nationalestraat 155, 2000 Antwerp, Belgium

<sup>d</sup> Veterinary Practice, Thnia Street, Ghardaïa, Algeria

## ARTICLE INFO

## Keywords:

*Trypanosoma evansi*  
PCR  
qPCR  
ELISA  
CATT  
Immune trypanolysis  
Diagnostic accuracy

## ABSTRACT

*Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) is a hemoflagellate parasite that affects a broad range of mammalian hosts and that causes a disease called surra. Diagnosis of surra based on clinical symptoms alone is inaccurate. Therefore, a variety of serological and molecular diagnostic tests are used to assist in the detection of *T. evansi* infections.

The aim of this study was to compare the diagnostic performance of four serological tests (CATT/*T. evansi*, immune trypanolysis, ELISA with purified variant surface glycoprotein RoTat 1.2 and with whole cell lysate) and two molecular PCR tests targeting sequences within the ribosomal genes locus (ITS1 TD PCR and 18S qPCR). Tests were carried out on blood samples from 161 dromedary camels, 93 horses, 129 goats, 168 sheep, 127 bovines and 76 dogs. Latent class analysis was carried out to calculate the sensitivity and specificity of each diagnostic test. Cohen's Kappa test was used to assess the concordance between the different diagnostic tests.

Overall positivity rates observed with the serological tests were as follows: 3.1 % with CATT/*T. evansi*, 4.9 % with ELISA/RoTat 1.2, 3.4 % with ELISA/whole lysate and 2.0 % with immune trypanolysis (TL). Among the 754 samples tested with the molecular tests, 1.7 % were positive with 18S qPCR and 1.3 % with ITS1 TD PCR. Cohen's Kappa test showed agreement ranging from fair to substantial ( $k = 0.2-0.8$ ) between serological diagnostic tests. However, it showed a perfect agreement ( $k = 0.868$ ) between molecular diagnostic tests. Latent class analysis showed that all serological tests were 100 % sensitive, in contrast to the molecular tests with 47 % sensitivity. All tests, though, were highly specific ( $\geq 97$  %).

Given the persistence of circulating antibodies after cure, detectable by serological tests, it is recommend combining a serological and a molecular diagnostic test for accurate diagnosis of infection with *T. evansi* in domestic animals.

### 1. Introduction

Surra is a trypanosomosis due to *Trypanosoma* (*T.*) *evansi*, the first ever pathogenic trypanosome described in horses and dromedaries from India (Hoare, 1972). *Trypanosoma evansi* is a flagellated protozoan parasite transmitted mechanically by different fly species like *Tabanus* sp. and *Stomoxys* sp. (Luckins, 1988; Brun et al., 1998) and in South America also by vampire bats (Hoare, 1972). *Trypanosoma evansi* affects a huge range of domestic and wild mammals around the world and especially camels and horses in Africa (Dia et al., 1997; Njiru et al., 2004; Gari et al., 2010; Birhanu et al., 2015; Fikru et al., 2015); camels,

horses, water buffalo and cattle in Asia (Abo-Shehadeh et al., 1999; Verloo et al., 2000; Hasan et al., 2006; Elshafie et al., 2013; Tehseen et al., 2015; Alanazi et al., 2018; Yadav et al., 2019) and horses, cattle and dogs in South America (Herrera et al., 2004; Jaimes-Dueñez et al., 2017; Ramírez-Iglesias et al., 2017). Sporadically, the parasite has caused outbreaks in Europe by importation of infected animals from endemic countries as was recently the case in Spain and France (Gutierrez et al., 2006; Desquesnes et al., 2009; Tamarit et al., 2010).

Clinical signs differ from one host species to another and vary from unapparent to lethal. In camels, surra causes intermittent fever, weakness, abortion and oedema. It is sometimes fatal within a few months

\* Corresponding author.

E-mail address: [karimaensv@gmail.com](mailto:karimaensv@gmail.com) (K. Benfodil).

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109089>

Received 4 November 2019; Received in revised form 13 March 2020; Accepted 16 March 2020  
0304-4017/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

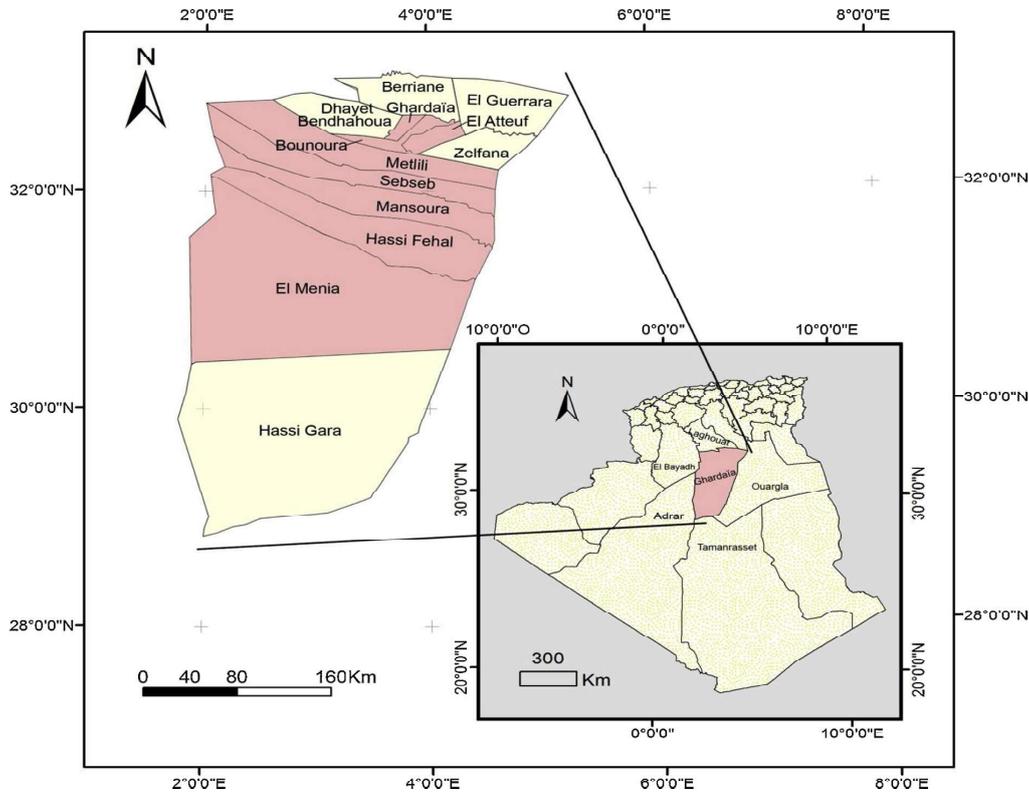


Fig. 1. Map of Algeria showing the wilaya of Ghardaïa and localisation of sampling sites.

but more chronic evolution lasting 2 to 3 years is demonstrated (Singh and Momin, 2008). Infection in horses is characterised by anaemia, icterus, weight loss and neurological signs with a mortality rate of about 50% (Rodrigues et al., 2009). In cattle and water buffaloes, surra is usually a chronic disease but clinical signs occur like abortion, weight loss and neurological disorders (Luckins, 1988). Sheep and goats are mainly asymptomatic (Desquesnes et al., 2013). In dogs, *T. evansi* causes a serious disease, often accompanied with blindness, and frequent fatal outcome (Echeverria et al., 2019).

Clinical signs are not pathognomonic and diagnosis can only be confirmed by laboratory tests. In routine practice, parasitological examination is usually limited to microscopic observation of a Giemsa stained thin blood smear or thick drop which are poorly sensitive in chronic infections with low numbers of parasites circulating in peripheral blood. Serological antibody detection tests on the other hand, have been proven to be very useful, especially for epidemiological surveys on surra (Atarhouch et al., 2003). Recommended serological techniques listed in the Terrestrial Manual of the World Organisation for Animal Health (OIE) are: ELISA with native *T. evansi* variant surface glycoprotein (VSG) RoTat 1.2 as antigen (ELISA/RoTat1.2), ELISA with whole *T. evansi* cell lysate as antigen (ELISA/WCL), the Card Agglutination Test for *T. evansi* (CATT/*T. evansi*), and an antibody-mediated complement lysis test (immune trypanolysis or TL) with *T. evansi* variable antigen type (VAT) RoTat 1.2 (OIE, 2018). Major disadvantages of serological tests are cross-reactivity with non-specific antibodies caused by other infections and the persistence of specific antibodies for weeks or months after successful treatment. As surrogate for parasitological diagnosis, molecular tests detect parasite-specific DNA or RNA and therefore are very specific. Moreover, DNA and RNA

disappear within days after successful treatment and RNA presence indicates active infection. Molecular tests for the diagnosis of surra are either specific for the subgenus Trypanozoon, to which *T. evansi* belongs together with *T. brucei* and *T. equiperdum* or specific for a certain *T. evansi* subtype (Claes et al., 2004; Njiru et al., 2006; Carnes et al., 2015). The OIE Terrestrial Manual recommends TBR PCR which targets a 177 bp repetitive microsatellite sequence present in Trypanozoon (Masiga et al., 1992; OIE, 2008). The high copy number of the 177 bp repeats renders the TBR PCR very sensitive but makes it also very prone to contamination during sampling, especially in large scale surveys (unpublished observations). Alternative tests for Trypanozoon detection, such as 18S PCR targeting a ribosomal gene and ITS1 PCR targeting the internal transcribed spacer 1 within the ribosomal locus have been described (Desquesnes et al., 2001). The former is Trypanozoon specific while the latter has the advantage that it detects the ITS1 in the genome of *T. congolense*, *T. vivax*, and Trypanozoon subgenus (including *T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*). To replace the conventional 18S PCR, Deborggraeve and co-workers (2011) developed a quantitative real time PCR targeting the 18S gene (18S qPCR). Recently, a touch-down variant of the ITS1 PCR (ITS1 TD PCR) was developed to reduce non-specific reactions often observed with specimens from cattle (Tran et al., 2014). It detects the ITS1 in the genome of *T. congolense*, *T. vivax*, and Trypanozoon subgenus (including *T. brucei*, *T. evansi*, *T. equiperdum*).

The aims of this study were: i) to determine the prevalence of *T. evansi* in dromedary camels, ruminants and dogs, with particular interest in detection of subclinical infections and putative reservoir hosts, ii) to compare the accuracy and to assess the concordance between six diagnostic methods used for diagnosis of *T. evansi*: TL, ELISA/RoTat 1.2,

ELISA/WCL, CATT/*T.evansi*, 18S quantitative PCR and ITS1 touchdown PCR.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study area

The study was carried out from May 2017 to February 2018 in the wilaya of Ghardaïa (Fig. 1). Ghardaïa is located in the north of the Algerian Sahara, about 600 km from the capital Algiers, between 33° and 31°15' N, 2°30' and 5° E. The climate is arid with very low rainfall (160 mm/year), very high summer temperatures (20 °C–45 °C) and low winter temperatures. The wilaya of Ghardaïa covers a total area of 86,560 km<sup>2</sup> (4 % of the Algerian territory). The pastoral area of Ghardaïa covers an area of 1,344,303 ha (15 % of the total area of the wilaya). It consists of: oued, daya, hamada, reg and erg and contains floristic diversity with *Anabasis articulata*, *Helianthemum lippii*, *Calligonum comosum* and *Stipagrostis pungens*.

### 2.2. Sampling procedure

A cross sectional survey was conducted on 161 dromedary camels, 93 horses, 127 cattle, 168 sheep, 129 goats, and 76 dogs. All animals were clinically healthy at the time of blood collection, but some had a history of clinical signs. Blood samples were collected from the jugular vein into plain vacuum tubes and EDTA tubes. Sera were prepared from blood in plain tubes after centrifugation. Serum and blood samples were stored at -20 °C until transported to the Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium.

### 2.3. Diagnostics tests

The CATT/*T.evansi* (Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium) is a direct agglutination test for detection of specific antibodies in blood, plasma and sera. It was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, 25 µl of serum, diluted 1:4 in phosphate buffered saline, and 45 µl of CATT antigen are mixed in a reaction zone of a plastic card. The card is placed on an electric rotator and rocked at 70 rpm for 5 min. The reaction is scored positive if blue agglutinates are visible by naked eye.

Immune trypanolysis (TL) is an antibody-mediated complement lysis test with a cloned *T. evansi* population expressing the RoTat 1.2 VSG. It is highly specific and therefore used as serological reference test for *T. evansi* type A (OIE, 2018). It was performed according to Van Meirvenne et al. (1995). Briefly, 25 µl of serum is diluted 1:2 in guinea pig serum (GPS, complement source) in a well of a microtiter plate. Thereafter 50 µl of a 10<sup>-7</sup>/ml suspension of live *T. evansi* RoTat 1.2 trypanosomes in GPS are added. The microtiter plate is shaken for a few seconds and kept at ambient temperature. After 90 min, 5 µl of the reaction mixture is dispensed on a microscope slide, covered with a cover slip and examined under a phase contrast microscope at 10 × 25 magnification. The test result is considered positive for anti-RoTat 1.2 antibodies when at least 50 % of the trypanosomes are lysed.

Indirect ELISA/RoTat 1.2 was carried out according to Verloo et al. (2000) and Lejon et al. (2005) and with minor modifications. VSG RoTat 1.2 was coated at 2 µg/ml in PBS (0.01 M; pH 7.4; 0.14 M NaCl). Half of the plate was left empty and served as antigen-free control. Dog, camel and horse sera were diluted 1:150 in PBS-Blotto (0.01 M; pH 7.4; 0.2 M NaCl; 8 mM NaN<sub>3</sub>; 10 g/l skimmed milk powder) while cattle, goat and sheep sera were diluted 1:200 in the same buffer. Hundred fifty µl of each serum were applied in duplicate in an antigen-containing and an antigen-free well and incubated at ambient temperature for 30 min. After washing, horse radish peroxidase HPO conjugates were added in each well. For camel: protein A-HPO Sigma, P8651, 1:10,000, horse: goat anti horse IgG H + L-HPO Jackson Immunoresearch 108-035-003, 1:40,000, for dog: rabbit anti dog IgG H + L-HPO Jackson Immunoresearch 304-035-003, 1:40,000, for sheep and goat: donkey anti goat IgG H + L-HPO Jackson Immunoresearch 705-035-003, 1:40,000, for cattle: goat anti bovine IgG H + L-HPO Jackson Immunoresearch 101-035-003, 1:40,000. Reactions were revealed with 1-Step Ultra TMB ELISA Substrate, Thermo Scientific 34029 and stopped by adding 150 µl of 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The optical density (OD) was read at 450 nm with a Multiskan RC ELISA reader. The corrected optical density (OD<sub>corr</sub>) of each serum was calculated by subtracting the mean OD in the two antigen-free wells from the mean OD in the two corresponding antigen containing wells. These corrected OD are expressed as percentage of the OD obtained with the strong positive control (percent positivity, PP). Indirect ELISA/WCL was carried out as described above but with a whole cell lysate coated at 2 µg/ml in PBS (0.01 M; pH 7.4; 0.14 M NaCl) (OIE, 2017). The WCL was prepared as follows: *T. evansi* RoTat 1.2 is grown in rats and separated from the rat blood by anion exchange chromatography on a DEAE cellulose column according to (Lanham and Godfrey, 1970). A 1 ml sediment of pure trypanosomes is lysed in ice cold hypotonic phosphate buffer (10 mM) and sonicated on ice. After cold centrifugation at 14,000 x g for 10 min and 17,000 x g for 10 min, the supernatant (WCL) is collected and protein content measured by UV absorption. This WCL is divided in small aliquots and stored at -80 °C prior to use.

As template in the molecular tests, DNA was extracted from 400 µl whole blood of each animal sample with the Maxwell® 16 DNA purification kit, according to the instructions of the manufacturer (Maxwell 16 DNA purification kit, Promega). DNA was stored at -80 °C until amplification.

ITS1 TD PCR was used to detect to allow simultaneous detection of all non-tsetse transmitted trypanosomes (*T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. vivax*). Specifications of the PCR are represented in Table 1. Amplifications were carried out in 50 µl final volume containing 5 µl of purified DNA and 45 µl of the master mix (800 µM of dNTPs, 0.2 µM of each primer (ITS-1-Forward, ITS-1-Reverse), 1 unit of HotStar Taq Plus DNA polymerase (Qiagen), 1 × Coral Load PCR buffer). Each PCR run included a non-template negative control (5 µl nuclease free water), a positive control (0.5 ng of each parasite DNA) and controls of DNA extractions. The reaction conditions were as follows: denaturation at 95 °C for 5 min, three cycles at 94 °C for 30 s, 70 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; three cycles at 94 °C for 30 s, 69 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; three cycles at 94 °C for 30 s, 68 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; three cycles at 94 °C for 30 s,

**Table 1**

Taxon specificity, target sequence, primers and amplicon lengths for the 18S qPCR, the ITS1 TD PCR and the EVAB PCR.

Target group	Sequence	Primers/Probe	Primers/probe sequences	Amplicon length	Reference
Trypanozoon	18S	M18SF M18SR	5'- CGTAGTTGAAGCTGTGGCCACGT -3' 5'- ATGCATGACATGCGTGAAGTGAG -3'	150 bp	(Deborggraeve et al., 2011)
<i>Trypanosoma</i> sp	ITS1	M18S probe ITS1 F ITS1 R	5'- TCGAGCTGTGTTTGACCCACGG-MGB-VIC-3' 5'-TGTAGGTGAACCTGCAGCTGGATC-3' 5'-CCAAGTCATCCATGGCAGACGTT- 3'	<i>T. vivax</i> : 150 bp, Trypanozoon: 450 bp, <i>T. congolense</i> : 650 bp	(Wagemans, 2011) (Tran et al., 2014)
<i>Trypanosoma evansi</i> type B	minicircle class B	EVAB1 EVAB2	5'-CACAGTCCGAGAGATAGAG-3' 5'- CTGTAICTACATCTACCTC-3'	436 bp	(Njiru et al., 2006)

67 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; three cycles at 94 °C for 30 s, 66 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; three cycles at 94 °C for 30 s, 65 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; 22 cycles at 94 °C for 30 s, 64 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and a final extension step at 72 °C for 5 min. PCR assays were performed in a Biometra T3000 cyclotherm (Germany). PCR products were analysed in UV illumination after electrophoresis in 2 % agarose gel and staining with ethidium bromide.

For specific detection of Trypanozoon taxa, the 18S qPCR assay used the M18S primers described by [Deborggraeve et al. \(2011\)](#) in combination with a novel probe predicted by Primer3 ([Table 1](#)). The reactions were conducted in a final volume of 20 µL, consisting of 5 µL of DNA template, 0.3 µM of each primer, 0.1 µM of a MGB-VIC labelled probe (Thermo Fischer Scientific) in Perfecta® qPCR UNG Low-Rox ToughMix® Quantabio qPCR was performed on a Quantstudio 5 (Applied Biosystems) as follows: 50 °C for 2 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and annealing and detection at 60 °C for 60 s. The cycle quantification values were calculated automatically and compared between runs using a *T. brucei* positive control.

To assess whether *T. evansi* type B also circulates in Algeria, the minicircle type B PCR, which is specific for *T. evansi* type B ([Njiru et al., 2006](#)), was performed exactly as described in [Birhanu et al. \(2016\)](#).

Statistical analyses were performed using R (version 3.5.1, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) via RStudio (version 1.1.383, RStudio Inc., Boston, MA). Results for the six diagnostic tests were analysed to establish associations between all possible combinations of test pairs. Cohen's kappa coefficients ([Cohen, 1960](#)) were used as a measure of concordance between each pair of tests using irr package in R ([Gamer et al., 2012](#)). Interpretation of the kappa coefficient was according to Landis and Koch ([Landis and Koch, 1977](#)) poor agreement: < 0.00; slight: 0.00–0.20; fair: 0.21–0.40; moderate: 0.41–0.60; substantial: 0.61–0.80; almost perfect: 0.81–1.00. By absence of a gold standard test for diagnosis of *T. evansi* infection, sensitivity and specificity of the different tests was assessed using the latent class analysis (LCA) via random LCA package in R ([Beath, 2017](#)). Latent class analysis assumes that the results obtained by imperfect tests are influenced by a common latent variable, which is the real infection status not directly measurable by each test separately.

### 3. Results

#### 3.1. Prevalence

The number of positive samples, according to the various diagnostic methods and host species, are shown in [Table 2](#). Regarding the serological tests, the highest proportion of positive animals was recorded with ELISA/RoTat 1.2, ranging from 0.8 % in goat to 9.9 % in camels and overall positivity rate of 4.9 %. With CATT/*T. evansi*, the overall positivity rate was 3.1 % ranging from 0.6 % in sheep to 9.3 % in camels. With ELISA/WCL, the overall positivity rate was 3.4 % ranging from 0% in horses to 9.3 % in camels. The lowest overall positivity rate (2.0 %) was observed with TL and positive animals (9.3 %) were only observed within the camel group.

Among the 754 tested samples, the 18S qPCR detected 12 positive camels and 1 positive goat while the ITS1 TD PCR detected only 10

**Table 3**

Specificity and sensitivity (in percentage) with 95 % confidence intervals (CI) of each test based on Latent Class Analysis.

	Sensitivity (95 % CI)	Specificity (95 % CI)
Immune trypanolysis	100 (100-100)	100 (100-100)
ELISA/RoTat 1.2	100 (100-100)	97 (95–98)
ELISA/WCL	100 (100-100)	99 (97–99)
CATT/ <i>T. evansi</i>	100 (100-100)	99 (95–100)
18S qPCR	47 (21–73)	98 (96–99)
ITS1 TD PCR	47 (22–75)	100 (87–100)

positive camels which were all positive for Trypanozoon and not for *T. vivax* or *T. congolense*. *Trypanosoma evansi* type B specific PCR remained negative for all tested animals, i.e. all dromedary camels and the 18S qPCR positive goat.

#### 3.2. Sensitivity and specificity of the diagnostic tests, assessed by latent class analysis

As shown in [Table 3](#), all serological tests were found to be 100 % sensitive while both molecular tests were 47 % sensitive. Specificities ranged from 97 % to 100 %.

#### 3.3. Concordance between the different diagnostic tests

The data on agreement between the six different tests are represented in [Table 4](#).

Among the serological tests, substantial agreement was observed between TL on the one hand and CATT/*T. evansi* and ELISA/WCL on the other hand while all other combinations showed moderate agreements with  $k$  between 0.515 and 0.599. In contrast, almost perfect agreement ( $k = 0.868$ ) was observed between the two molecular tests. The agreements between the serological tests and molecular test were fair to moderate.

### 4. Discussion

Our study confirms that *T. evansi* is present in Algeria particularly in dromedary camels, as observed in other studies carried out elsewhere in this country ([Bennoune et al., 2013](#); [Boushaki et al., 2019](#)). Depending on the diagnostic test, prevalences ranged from 6.2 %–13 % which is much lower than what is reported from some other countries. For example, observed prevalences of *T. evansi* in dromedaries in Egypt were 31 % and 71 % in respectively RoTat 1.2 PCR and TBR PCR ([Elhaig and Sallam, 2018](#)), 26.6 % using Trypanozoon-specific and *T. evansi* minicircle-specific primer sets in Kenya ([Njiru et al., 2004](#)), 30 % and 32 % with respectively RoTat 1.2 PCR and TBR1/2 PCR in Pakistan ([Tehseen et al., 2015](#)). Also with serological tests, extremely high prevalences were recorded in Egyptian camels: 82 % with CATT/*T. evansi* and 64 % with ELISA/*T. evansi* ([Zayed et al., 2010](#)). In Mauritania and Ethiopia, seroprevalences obtained in CATT/*T. evansi* were between 14 % and 24 % ([Dia et al., 1997](#); [Birhanu et al., 2015](#); [Fikru et al., 2015](#)). The relatively low prevalences in our study, together with the apparent health

**Table 2**

Number and percentage of positive results obtained in each test for each host species.

Host	Number	TL	ELISA/RoTat 1.2	ELISA/WCL	CATT/ <i>T. evansi</i>	18S qPCR	ITS1 TD PCR
Camel	161	15 (9.3 %)	16 (9.9 %)	15 (9.3 %)	15 (9.3 %)	12 (13 %)	10 (6.2 %)
Horse	93	0	1 (1%)	0	3 (3.2 %)	0	0
Goat	129	0	1 (0.8 %)	4 (3.1 %)	2 (1.5 %)	1 (0.8 %)	0
Sheep	168	0	11 (6.5 %)	4 (2.4 %)	1 (0.6 %)	0	0
Cattle	127	0	4 (3.1 %)	2 (1.6 %)	1 (0.8 %)	0	0
Dog	76	0	4 (5.3 %)	1 (1.3 %)	1 (1.3 %)	0	0
Total	754	15 (2.0 %)	37 (4.9 %)	26 (3.4 %)	23 (3.1 %)	13 (1.7 %)	10 (1.3 %)

**Table 4**

Agreement between the different diagnostic tests to detect *T. evansi*.  $k = \text{kappa}$  ( $< 0 = \text{poor}$ ,  $0-0.2 = \text{slight}$ ,  $0.21-0.4 = \text{fair}$ ,  $0.41-0.6 = \text{moderate}$ ,  $0.61-0.8 = \text{substantial}$ ,  $0.81-1 = \text{almost perfect}$ ); P = positive; N = negative.

		ELISA/RoTat 1.2		ELISA/WCL		CATT/ <i>T.evansi</i>		18S qPCR		ITS1 TD PCR	
		P	N	P	N	P	N	P	N	P	N
Immune trypanolysis	P	15	0	15	0	15	0	7	8	7	8
	N	22	717	11	728	8	731	6	733	3	736
	K	0.565		0.725		0.784		0.491		0.553	
ELISA/RoTat 1.2	P			18	19	16	21	7	30	7	30
	N			8	709	7	710	6	711	3	714
	K			0.553		0.515		0.261		0.283	
ELISA/WCL	P					15	11	7	19	7	19
	N					8	720	6	722	3	714
	K					0.599		0.344		0.377	
CATT/ <i>T.evansi</i>	P							7	16	7	16
	N							6	725	3	728
	K							0.375		0.413	
18S qPCR	P									10	3
	N									0	741
	K									0.868	

of the sampled dromedaries, suggest that *T. evansi* is endemic in Ghardaïa district.

All horses were negative in the molecular tests, TL and ELISA/WCL. The few animals that were positive in ELISA/RoTat 1.2 and CATT/*T.evansi* were not confirmed in TL and therefore may be considered as false positives. This result is in sharp contrast with the prevalence of 45 % observed in a previous study conducted in El-Bayadh district in south-western Algeria using CATT/*T.evansi* (Benfodil et al., 2019). In the same El-Bayadh district, a high mortality rate was recorded in dromedaries (Boushaki et al., 2019) suggesting an ongoing epidemic of surra that also may have affected horses. In a survey conducted in northern Ethiopia, 7 of 25 horses were positive in PCR RoTat 1.2 but also none were positive in TL thus casting doubt on the specificity of the molecular test (Birhanu et al., 2015). *Trypanosoma evansi* not only affects horses in Africa but also in other continents, for example in Asia where 13 % of horses tested in Malaysia were found positive in CATT/*T.evansi* (Elshafie et al., 2013) and 27 % of horses in India were positive in ELISA/*T.evansi* (Laha and Sasmal, 2008). In Brazil, Herrera and co-workers recorded even 73 % (234/321) IFAT positive horses while 10 % were positive in the microhaematocrit centrifugation technique (Herrera et al., 2004).

Since we were interested in putative reservoirs of *T. evansi* in the study area, we also tested ruminants and dogs. None of the goats, sheep, cattle and dogs were positive in TL and both molecular tests, with the exception of 1 goat that was positive in 18S qPCR. Seroprevalences in the other serological tests ranged from 0.6 % of the sheep in CATT up to 6.5 % of the sheep in ELISA/RoTat 1.2. Again, the negative TL and PCR results suggest false positivity in CATT and the ELISAs, for example due to infections with the non-pathogenic *T. melophagium* in sheep or *T. theileri* in cattle.

The possibility that in the study area, *T. evansi* strains circulate that do not express the RoTat 1.2 VSG like in Kenya and Ethiopia (Njiru et al., 2006; Birhanu et al., 2015) might have been the cause that 6 and 3 camels are positive in respectively 18S qPCR and ITS TD PCR but negative in TL and the other serological tests. However, when tested with the *T. evansi* type B specific PCR, all dromedary camels and the 18S qPCR positive goat were negative, making it improbable that seropositive animals were infected with a *T. evansi* type B strain. Thus, with the current data, we cannot confirm that ruminants and dogs act as reservoir of *T. evansi* in the study area, notwithstanding that small ruminants and dogs are susceptible to the infection (Aregawi et al., 2019).

To assess the diagnostic accuracy of diagnostic tests in the absence of a gold standard, we used an LCA approach that revealed 100 % sensitivity of all serological tests and < 50 % sensitivity of both molecular tests. The high sensitivity of the antibody detection tests results

from the fact that infected animals produce high amounts of persistent anti-*T. evansi* antibodies (Verloo et al., 2000). The lower sensitivity of the molecular tests, on the other hand, can be explained by the usually low parasite load in chronic surra cases resulting in parasite DNA concentrations below the lower detection limit of the PCRs. In addition, successful treatment will clear an animal from *T. evansi* parasites or their DNA within two days (Desquesnes et al., 1995; Clausen et al., 1999; Desquesnes and Dávila, 2002).

The result will be animals that are negative in DNA detection tests but still positive in antibody detection tests. As mentioned above, the concordance analysis shows quite a number of camels that were positive in the molecular tests but negative in the serological tests which may suggest recent infections sampled before the apparition of specific antibodies as observed in experimental studies (Ramírez-Iglesias et al., 2011).

Regarding specificity, LCA shows that all tests are highly specific with overlapping 95 % intervals except for the TL with absolute specificity. This result is in line with previous studies that showed TL as gold standard for detection of antibodies against *T. evansi* in buffaloes (Holland et al., 2002). However, the equally high specificities of the other tests are in contrast with the above discussed assumption of false positive reactions occurring in ELISA/WCL, ELISA/RoTat 1.2 and CATT/*T.evansi* with the horses, ruminants and dogs.

The concordance analysis showed a moderate to substantial agreement between TL, ELISA/WCL, ELISA/RoTat 1.2 and CATT/*T.evansi*, which is expected since all serological tests are detecting antibodies against the same *T. evansi* strain used for preparing the antigen, as observed in other studies in Ethiopia and Pakistan (Birhanu et al., 2015; Tehseen et al., 2015). Agreement is highest between TL and CATT/*T.evansi* ( $k = 0.784$ ), thus confirming the interest of using CATT/*T.evansi* for serodiagnosis of surra in the field as alternative to the use of TL or ELISA which are tests that are restricted to well-equipped laboratories. Agreement between the molecular tests was almost perfect and both tests have similar diagnostic sensitivity and specificity of both tests are similar. Therefore, one can choose either test to confirm a *T. evansi* infection in a serologically or clinically suspect animal.

The results obtained in this study confirm that surra is prevalent in the study area and that it is present mainly in dromedary camels. We have no firm evidence of other domestic animal species that may be infected with *T. evansi*. Diagnosis of surra in Algeria could be based on a combination of screening for *T. evansi*-specific antibodies followed by confirmation of infection by a molecular tests and treatment of confirmed animals. Diagnosis preferably is confirmed as close as possible to the point-of-care (POC). Serological screening at POC is possible with CATT/*T.evansi* but not yet with the molecular tests that we used in this

study, thus necessitating further research on the development of field-applicable molecular diagnostics (Chiweshe et al., 2019).

#### CRedit authorship contribution statement

**Karima Benfodil:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision. **Philippe Büscher:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Funding acquisition. **Amine Abdelli:** Writing - review & editing, Formal analysis. **Nick Van Reet:** Writing - review & editing, Validation. **Abdellah Mohamed-herif:** Methodology, Validation. **Samir Ansel:** Methodology, Validation. **Said Fettata:** Methodology, Validation. **Sara Dehou:** Methodology, Validation. **Nicolas Bebronne:** Methodology, Validation. **Manon Geerts:** Methodology, Validation. **Fatima Balharbi:** Methodology, Validation. **Khatima Ait-Oudhia:** Conceptualization, Methodology, Resources, Writing - original draft, Writing - review & editing, Visualization, Supervision.

#### Declaration of Competing Interest

None.

#### Acknowledgements

We thank the veterinarians of the agriculture service of the wilaya of Ghardaia for their help in collecting samples. We thank all owners for field assistance.

We thank the OIE Reference Laboratory for Surra for allowing us to carry out the diagnostic tests at the Institute of Tropical Medicine in Antwerp and the High National Veterinary School of Algiers, Algeria for funding the stay of Karima Benfodil in Belgium.

We also thank Dr. Meryam Krit of the Institute of Tropical Medicine Antwerp for helping in data interpretation.

#### References

- Abu-Shehadeh, M.N., Anshassi, H., Mustafa, G., Amr, Z., 1999. Prevalence of Surra among camels and horses in Jordan. *Prev. Vet. Med.* 38, 289–293.
- Alanazi, A.D., Puschendorf, R., Salim, B., Alyouf, M.S., Alanazi, I.O., Al-shehri, H.R., 2018. Molecular detection of equine trypanosomiasis in the Riyadh Province of Saudi Arabia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 30, 942–945. <https://doi.org/10.1177/1040638718798688>.
- Aregawi, W.G., Agga, G.E., Abdi, R.D., Büscher, P., 2019. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasit. Vectors* 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>.
- Atarhouch, T., Rami, M., Bendahman, M.N., Dakkak, A., 2003. Camel trypanosomiasis in Morocco 1: results of a first epidemiological survey. *Vet. Parasitol.* 111, 277–286. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00382-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00382-5).
- Beath, K.J., 2017. Random LCA: an R package for latent class with random effects analysis. *J. Stat. Softw.* 81. <https://doi.org/10.18637/jss.v081.i13>.
- Benfodil, K., Ansel, S., Mohamed Cherif, A., Ait Oudhia, K., 2019. Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* 70, 1631–1638. <https://doi.org/10.12681/jhvms.21786>.
- Bennoune, O., Adili, N., Amri, K., Bennecib, L., Ayachi, A., 2013. Trypanosomiasis of camels (*Camelus dromedarius*) in Algeria: first report. *Vet. Res. Forum: An International Quarterly Journal. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*, pp. 273.
- Birhanu, H., Fikru, R., Said, M., Kidane, W., Gebrehiwot, T., Hagos, A., Alemu, T., Dawit, T., Berkvens, D., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2015. Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, northern Ethiopia. *Parasit. Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0818-1>.
- Birhanu, H., Gebrehiwot, T., Goddeeris, B.M., Büscher, P., Reet, N.V., 2016. New *trypanosoma evansi* type B isolates from Ethiopian dromedary camels. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004556. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004556>.
- Boushaki, D., Adél, A., Dia, M.L., Büscher, P., Madani, H., Brihoum, B.A., Sadaoui, H., Bouayed, N., Kechemir Issad, N., 2019. Epidemiological investigations on *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the South of Algeria. *Heliyon* 5, e02086. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02086>.
- Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.-R., 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.* 79, 95–107. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00146-0).
- Chiweshe, S.M., Steketee, P.C., Jayaraman, S., Paxton, E., Neophytou, K., Erasmus, H., Labuschagne, M., Cooper, A., MacLeod, A., Grey, F.E., Morrison, L.J., 2019. Parasite specific 7SL-derived small RNA is an effective target for diagnosis of active trypanosomiasis infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007189. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007189>.
- Clausen, P.-H., Waiswa, C., Katunguka-Rwakishaya, E., Schares, G., Steuber, S., Mehlitz, D., 1999. Polymerase chain reaction and DNA probe hybridization to assess the efficacy of diminazene treatment in *Trypanosoma brucei*-infected cattle. *Parasitol. Res.* 85, 206–211. <https://doi.org/10.1007/s004360050536>.
- Cohen, J., 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20, 37–46. <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>.
- Deborggraev, S., Lejon, V., Ekangu, R.A., Mumba Ngoyi, D., Pati Pyana, P., Ilunga, M., Mulunda, J.P., Büscher, P., 2011. Diagnostic accuracy of PCR in gambiense sleeping sickness diagnosis, staging and post-treatment follow-up: a 2-year longitudinal study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e972. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000972>.
- Desquesnes, M., Dávila, 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. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4).
- Desquesnes, M., (de) La Rocque, S., Peregrine, A.S., 1995. French guyanese stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride. *Acta Trop.* 60, 133–136. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(95\)00117-W](https://doi.org/10.1016/0001-706X(95)00117-W).
- Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungrana, A., Dávila, A.M., 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. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00161-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00161-8).
- Desquesnes, M., Bossard, G., Thévenon, S., Patrel, D., Ravel, S., Pavlovic, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E., Holzmüller, P., Berthier, D., Jacquet, P., Cuny, G., 2009. Development and application of an antibody-ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. *Vet. Parasitol.* 162, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.033>.
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R., Jittaplapong, S., 2013. *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed Res. Int.* 2013, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>.
- Dia, M.L., Diop, C., Aminetou, M., Jacquet, P., Thiam, A., 1997. Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* in camels in Mauritania. *Vet. Parasitol.* 72, 111–120.
- Echeverría, J.T., Soares, R.L., Crepaldi, B.A., Oliveira, G.Gde, Silva, P.M.Pda, Pupin, R.C., Martins, T.B., Cleveland, H.P.K., Ramos, C.Ado N., Borges, Fde A., 2019. Clinical and therapeutic aspects of an outbreak of canine trypanosomiasis. *Rev. Bras. Parasitol.* 28, 320–324. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019018>.
- Elhaig, M.M., Sallam, N.H., 2018. Molecular survey and characterization of *Trypanosoma evansi* in naturally infected camels with suspicion of a Trypanozoon infection in horses by molecular detection in Egypt. *Microb. Pathog.* 123, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.017>.
- Elshafie, E.I., Sani, R.A., Hassan, L., Sharma, R., Bashir, A., Abubakar, I.A., 2013. Seroprevalence and risk factors of *Trypanosoma evansi* infection in horses in Peninsular Malaysia. *Res. Vet. Sci.* 94, 285–289. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.09.004>.
- Fikru, R., Andualem, Y., Getachew, T., Menten, J., Hasker, E., Merga, B., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2015. Trypanosome infection in dromedary camels in Eastern Ethiopia: prevalence, relative performance of diagnostic tools and host related risk factors. *Vet. Parasitol.* 211, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.008>.
- Gamer, M., Lemon, J., Fellows, I., Singh, P., 2012. IRR: Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement (R Package Version 0.84) [Computer Software].
- Gari, F.R., Ashenafi, H., Tola, A., Goddeeris, B.M., Claes, F., 2010. Comparative diagnosis of parasitological, serological, and molecular tests in dourine-suspected horses. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1649–1654. <https://doi.org/10.1007/s11250-010-9615-1>.
- Gutierrez, C., Corbera, J.A., Morales, M., Büscher, P., 2006. Trypanosomiasis in goats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 300–310. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.040>.
- Hasan, M.U., Muhammad, G., Gutierrez, C., Iqbal, Z., Shakoor, A., Jabbar, A., 2006. Prevalence of *trypanosoma evansi* infection in equines and camels in the Punjab Region, Pakistan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 322–324. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.043>.
- Herrera, H.M., Dávila, A.M.R., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Vet. Parasitol.* 125, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.013>.
- Hoare, C.A., 1972. The Trypanosomes of Mammals. A Zoological Monograph. The Trypanosomes of Mammals. A zoological monograph.
- Holland, W.G., Thanh, N.G., My, L.N., Magnus, E., Verloof, D., Büscher, P., Goddeeris, B., Vercrusse, J., 2002. Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper discs in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Trop.* 81, 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00211-X).
- Jaimes-Duñez, J., Triana-Chávez, O., Valencia-Hernández, A., Sánchez-Arévalo, D., Poche-Geballos, A., Ortiz-Álvarez, J., Mejía-Jaramillo, A.M., 2017. Molecular diagnosis and phylogeographic analysis of *Trypanosoma evansi* in dogs (*Canis lupus familiaris*) suggest an epidemiological importance of this species in Colombia. *Prev. Vet. Med.* 139, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.02.007>.
- Laha, R., Sasmal, N.K., 2008. Endemic status of *Trypanosoma evansi* infection in a horse stable of eastern region of India – a field investigation. *Trop. Anim. Health Prod.* 40, 357–361. <https://doi.org/10.1007/s11250-007-9107-0>.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159–174.
- Lanham, S.M., Godfrey, D.G., 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 28, 521–534. <https://doi.org/>

- 10.1016/0014-4894(70)90120-7.
- Lejon, V., Claes, F., Verloo, D., Maina, M., Urakawa, T., Majiwa, P.A.O., Büscher, P., 2005. Recombinant RoTat 1.2 variable surface glycoprotein as antigen for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in dromedary camels. *Int. J. Parasitol.* 35, 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.12.015>.
- Luckins, A.G., 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today* 4, 137–142. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90188-3).
- 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. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90047-0](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90047-0).
- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Ndong'u, J.M., Robertson, I., Okaye, S., Thompson, R.C.A., Reid, S.A., 2004. Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/T. *evansi* tests in Kenya. *Vet. Parasitol.* 124, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.029>.
- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Masiga, D.K., Reid, S.A., Thompson, R.C.A., Gibson, W.C., 2006. Characterization of *Trypanosoma evansi* type B. *Infect. Genet. Evol.* 6, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2005.08.002>.
- OIE, 2008. OIE (World Organisation for Animal Health), 2008. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (mammals, Birds and Bees)*. OIE, Paris 6. Ed. Ed.
- OIE, 2017. OIE (World Organisation for Animal Health), 2017. *Recueil des protocoles standardisés des techniques de diagnostic des trypanosomoses animales d'origine africaine*. Last accession date 01 october 2019.
- OIE, 2018. OIE (World Organisation for Animal Health), 2018. *Trypanosoma evansi* Infection (Surra). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 3.1.21. [WWW Document]. URL [https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.01.21\\_TRYPANO\\_SURRA.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.21_TRYPANO_SURRA.pdf) (Accessed 9.22.19).
- Ramírez-Iglesias, J.R., Eleizalde, M.C., Gómez-Piñeres, E., Mendoza, M., 2011. *Trypanosoma evansi*: a comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Exp. Parasitol.* 128, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.010>.
- Ramírez-Iglesias, J.R., Eleizalde, M.C., Reyna-Bello, A., Mendoza, M., 2017. Molecular diagnosis of cattle trypanosomes in Venezuela: evidences of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* infections. *J. Parasit. Dis.* 41, 450–458. <https://doi.org/10.1007/s12639-016-0826-x>.
- Rodrigues, A., Figuera, R.A., Souza, T.M., Schild, A.L., Barros, C.S.L., 2009. Neuropathology of naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection of horses. *Vet. Pathol.* 46, 251–258.
- Singh, V., Momin, R.R., 2008. Common parasitic diseases of camel. *Vet. World* 1, 317.
- Tamarit, A., Gutierrez, C., Arroyo, R., Jimenez, V., Zagalá, G., Bosch, I., Sirvent, J., Alberola, J., Alonso, I., Caballero, C., 2010. *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. *Vet. Parasitol.* 167, 74–76. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.050>.
- Tehseen, S., Jahan, N., Qamar, M.F., Desquesnes, M., Shahzad, M.I., Deborggraeve, S., Büscher, P., 2015. Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasit. Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1002-3>.
- Tran, T., Napier, G., Rowan, T., Cordel, C., Labuschagne, M., Delespau, V., Van Reet, N., Erasmus, H., Joubert, A., Büscher, P., 2014. Development and evaluation of an ITS1 “Touchdown” PCR for assessment of drug efficacy against animal African trypanosomosis. *Vet. Parasitol.* 202, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.005>.
- Van Meirvenne, N., Magnus, E., Büscher, P., 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.* 60, 189–199. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(95\)00127-z](https://doi.org/10.1016/0001-706x(95)00127-z).
- Verloo, D., Holland, W., My, L.N., Thanh, N.G., Tam, P.T., Goddeeris, B., Vercrucysse, J., Büscher, P., 2000. Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Vet. Parasitol.* 92, 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00284-3).
- Wagemans, G., 2011. Real-time Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. MSc Thesis. Groep T, KULeuven.
- Yadav, S.C., Kumar, P., Khurana, S., Kumar, R., 2019. Seroprevalence of *trypanosoma evansi* infection in equines of north and north western states of India. *J. Equine Vet. Sci.* 79, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.jvevs.2019.05.019>.
- Zayed, A.A., Habeeb, S.M., Allam, Na.T., Ashry, H.M.Z., Mohamed, A.H.H., Ashour, A.A., Taha, H.A., 2010. A critical comparative study of parasitological and serological differential diagnostic methods of *Trypanosoma evansi* infections in some farm animals in Egypt. *Am.-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 8, 633–642.

# **Chapitre 6 : Discussion Générale et Conclusion**

## 1. Epidémiologie de *Trypanosoma evansi*: prévalence et facteurs de risque

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi deux wilayates du Sud algériens. Ce choix n'est pas fortuit. La wilaya d'El-Bayadh a été choisie pour l'étude de la trypanosomose à *T. evansi* chez les équidés uniquement à cause de : (i) la forte concentration des élevages de chevaux et la wilaya de Ghardaïa, (ii) à cause de la forte concentration des élevages de dromadaires principal hôte de *T. evansi* en Afrique, (iii) la wilaya a connu un développement important dans la production laitière chez différentes espèces animales (dromadaires, bovins et caprins). Nous avons jugé important d'étudier l'impact de *T. evansi* sur les animaux d'élevage, ainsi que sur son aspect économique et sanitaire. L'élevage des chevaux est également d'une grande importance, due principalement aux diverses activités exercées dans la région, principalement de loisir.

Il faut noter qu'en Algérie, la lutte contre les trypanosomoses animales n'est connue que chez les dromadaires. Aucune mention n'est faite pour d'autres espèces telles que les équidés, les bovins, les petits ruminants et autres. C'est pourquoi, il aurait été intéressant de faire des investigations sur toutes les espèces animales et parcourir toutes les régions du pays afin de mieux s'acquérir de la situation réelle de la maladie à l'échelle nationale. Cependant, du fait de nos moyens logistiques et financiers limités, nous nous sommes intéressés uniquement à la wilaya de Ghardaïa et El-Bayadh.

Sur le terrain, l'obtention des échantillons de sang de plusieurs espèces n'a pas été aisée compte tenu des réticences des propriétaires, la difficulté de la contention dans le cas des dromadaires et l'accès difficile à certaines localisations d'élevage. En effet les prélèvements de sang pour la recherche sur la trypanosomose constituaient pour les éleveurs des facteurs limitant la performance de leurs animaux.

### 1.1 Prévalence

Les tests sérologiques ont révélé le passage des trypanosomes chez plusieurs espèces animales incluses dans cette étude avec des taux différents d'une espèce à une autre et d'un test à un autre. Parmi les 161 dromadaires testés les prévalences retrouvées sont comme suit : (15/161) 9.3% avec TL, (16/161) 9.9% avec ELISA RoTat 1.2, (15/161) 9.3% avec ELISA whole lysate, (15/161) 9.3% avec CATT/*T.evansi*. Les tests moléculaires ont révélé des prévalences de (13%) et de (6.2%) en utilisant PCR ITS1 et PCR 18S, respectivement. Ce résultat confirme la présence de *T. evansi* chez les

dromadaires en Algérie comme il a été démontré dans de précédentes études (Bennoune et al., 2013; Boushaki et al., 2019). Les prévalences enregistrées avec les différents tests sont inférieures à celles retrouvées dans d'autres pays : En Egypte les prévalences rapportées sont 31% et 71% en utilisant RoTat 1.2 PCR et TBR PCR, respectivement (Elhaig and Sallam, 2018) ; 26.6% au Kenya en utilisant le primer spécifique Trypanozoon (Njiru et al., 2004), 30% et 32% avec RoTat 1.2 PCR et TBR1/2 PCR au Pakistan (Tehseen et al., 2015). Concernant les tests sérologiques, de fortes prévalences ont été retrouvées en Egypte en utilisant le CATT/*T. evansi* (82%) et l'ELISA/*T. evansi* (64%) (Zayed et al., 2010). En Ethiopie et en Mauritanie, les séroprévalences obtenues en utilisant le CATT/*T. evansi* sont entre 14% et 24% (Dia et al., 1997; Birhanu et al., 2015; Fikru et al., 2015).

Pour les chevaux, la séropositivité a été moins importante dans la wilaya de Ghardaïa, les anticorps anti *T. evansi* ont été uniquement détectés avec ELISA/VSG RoTat 1.2 (1/93) 1% et CATT/*T. evansi* (3/93) 3.2% ; ce qui diffère des résultats retrouvés dans la wilaya d'El Bayadh avec une prévalence de 45% en utilisant le CATT/*T. evansi* (Benfodil et al., 2019). Une étude réalisée par Boushaki et al (2019) dans la wilaya d'El-Bayadh a rapporté de fortes mortalités chez les dromadaires incluant le *T. evansi* comme origine. Le parasite peut se transmettre des dromadaires aux chevaux en présence des vecteurs dans cette région enzootique au surra. D'autres enquêtes ont montré des séroprévalences inférieures à celle retrouvée dans notre étude. En Malaisie, Elshafie et al (2013) ont trouvé une séroprévalence de 13,9% en utilisant le CATT/*T. evansi*. Une étude menée dans une ferme de chevaux dans la région Est de l'Inde a révélé une séroprévalence élevée de 27% ce qui confirme la situation enzootique de la maladie en Inde (Laha and Sasmal, 2008).

Parmi nos objectifs, la recherche des réservoirs possibles de *T. evansi*. Des échantillons biologiques des ruminants et des chiens ont été réalisés dans la wilaya de Ghardaïa. Chez les petits ruminants, 12 animaux ont été positifs en utilisant l'ELISA/VSG RoTat 1.2 [caprins : (1/129) 0.8%, ovins : (11/168) 6.5%], 8 animaux avec ELISA whole lysate [caprins : (4/129) 0.8%, ovins : (4/168) 6.5%] et 3 animaux avec CATT/*T. evansi* [caprins : (2/129) 0.8%, ovins : (1/168) 6.5%]. Aucun résultat positif n'a été retrouvé en utilisant la TL et les tests moléculaires sauf pour les caprins où un seul cas a été démontré positif en PCR 18S. A notre connaissance, c'est la première détection moléculaire de *T. evansi* chez les caprins en Algérie. Ce résultat peut conduire à plus

d'investigations sur l'infection à *T. evansi* chez les caprins. En Algérie, Les troupeaux de dromadaires (principale hôte de *T. evansi*) sont généralement en cohabitation avec les caprins qui peuvent être des réservoirs du parasite.

Chez les bovins 3.1% sont positifs en ELISA/VSG RoTat 1.2 et seulement 1.6% en ELISA /WCL. Une étude effectuée en Tunisie a rapporté une prévalence de 10% avec PCR ITS1 (Sallemi et al., 2018). Les bovins sont faiblement susceptibles à *T. evansi* (Desquesnes et al., 2013b).

Chez les chiens, (4/76) 5.3% ont été positifs avec ELISA/VSG RoTat 1.2 et seulement (1/76) 1.3% avec CATT/*T. evansi*. Récemment en Tunisie, une étude a confirmé la présence moléculaire et parasitologique de *T. evansi* chez un chien infecté cliniquement (Rjeibi et al., 2015).

La prévalence de *T. evansi* chez les ruminants et les chiens est faible. Nos résultats confirment ce qui a été rapporté par Desquesnes et al (2013): *T. evansi* est un parasite des dromadaires en Afrique. De rares études ont révélé la présence de l'infection chez les chiens, les chevaux et les ruminants (Aregawi et al., 2019).

## 1.2 Analyse des facteurs de risques

### • Les dromadaires (dans la wilaya de Ghardaïa) :

L'analyse statistique a permis d'identifier les facteurs associés à la séropositivité des dromadaires vis-à-vis de *T. evansi*. L'étude des facteurs de risques n'a pas été faite chez les autres espèces, la prévalence retrouvée n'a pas été importante.

Nos résultats ont montré un effet significatif de la taille du troupeau sur la séropositivité vis-à-vis de *T. evansi*. Les dromadaires vivants dans des troupeaux de taille < 50 ont 8.2 fois plus de chance d'être affectés que les animaux vivants dans de grands cheptels ( $\geq 50$ ) ( $P = 0.013$ ,  $OR = 8.22$ ,  $CI95\% = 1.64-49.75$ ). En ce qui concerne l'activité des dromadaires, les animaux de course sont plus affectés que les animaux destinés à la production ( $P = 0.003$ ,  $OR = 0.01$ ,  $CI95\% = 0.001-0.18$ ). Les dromadaires de courses sont en déplacement permanent pour participer aux différentes activités de loisir et compétitions ce qui augmente la possibilité d'être en contact avec des animaux malades.

L'analyse statistique n'a révélé aucune différence significative quant à l'âge des animaux. Ces résultats sont différents de ceux retrouvés par Dia et al. (1997), Atarhouch et al. (2003) et Fikru et al. (2015) qui ont rapporté que l'infection à *T. evansi* augmente chez les animaux de plus de 11 ans par rapport aux jeunes animaux ce qui est due à la longue durée d'exposition au parasite.

Nous avons constaté que les dromadaires présentant des signes cliniques (comme : l'anémie, la perte de poids et la diarrhée) ont 22 fois plus de chance d'être infecté par *T. evansi* que les animaux sans signes cliniques. Les signes cliniques peuvent être dus à la trypanosomose elle-même. Après une fièvre intermittente de 8 jours l'infection à *T. evansi* peut causer de l'anémie, une perte de poids et des œdèmes dans les régions déclives (Singh and Momin, 2008). La faiblesse des animaux suite à la malnutrition ou les autres infections augmente la susceptibilité des dromadaires au surra (Swai et al. 2011).

La séropositivité est plus élevée chez les femelles (14%) que les males (7.6%), mais aucune différence significative n'a été révélée. Ce résultat est similaire à l'étude de Ngaira et al. (2004). D'autres études ont rapporté que les femelles sont significativement plus affectées que les males (Dia et al. 1997 ; Tehseen et al. 2015). L'immunosuppression due à la gestation et la lactation peut augmenter la susceptibilité des dromadaires à l'infection à *T. evansi*. Une étude au Kenya a montré que les males ont 2.2 fois plus de chance d'être affecté que les femelles (Njiru et al. 2004).

Concernant le type d'élevage, aucune différence significative n'a été démontrée. Ce résultat diffère des données retrouvées dans des études où le système extensif est considéré comme facteur de risque de l'infection à *T. evansi* chez les dromadaires en Mauritanie et au Kenya (Dia et al. 1997; Ngaira et al. 2004). Dans ces pays africains, contrairement au cas de l'Algérie, le nomadisme est le système d'élevage de dromadaire dominant. Le nomadisme est basé sur un système extensif. Les nomades sont en recherche permanente de végétation et de sources d'eau pour leurs animaux, ce milieu est aussi favorable à la prolifération des vecteurs de *T. evansi* (tabanides et stomoxes) (Dia et al. 1997; Delafosse and Doutoum, 2004).

La seroprévalence vis-à-vis de *T. evansi* n'a pas varié de façon statistiquement significative en fonction de la race des dromadaires ce qui rejoint les résultats d'une étude faite au Pakistan (Tehseen et al. 2015). Au contraire, dans une étude réalisée aux

Emirates Arabes par Elwathig et al. (2016) une différence significative a été démontrée entre les différentes couleurs de robes des animaux. Les dromadaires avec une robe claire sont plus affectés que les animaux avec robes foncées.

Aucune différence significative n'a été détectée par rapport à la présence d'historique d'avortement dans l'élevage. L'avortement est un signe majeur de la trypanosomose mais il peut être également dû à d'autres agents pathogènes. Deux études réalisées dans la wilaya de Ghardaïa, *Coxiella burnetti* avec une seroprévalence de 74% (Benaïssa et al. 2017) et *Toxoplasma gondii* avec une seroprévalence de 9.8% (Mohamed-Cherif et al. 2019).

- **Les équidés dans la wilaya d'El-Bayadh**

Aucune catégorie d'âge n'a été révélée comme facteur de risque pour l'infection à *T. evansi* chez les chevaux. Toutes les tranches d'âge sont sujettes à l'infection par *T. evansi* quel que soit l'espèce affectée. Ce résultat est similaire à ce qui a été démontré par Elshafi et al (2013), en Malaisie. Chez les chevaux, le risque d'infection des mâles est diminué de 67% par rapport aux femelles (P=0.006, OR=0.37, 95% CI= 0.17-0.74%). Les caractéristiques biologiques des femelles telles que : l'immunosuppression due à la gestation peuvent augmenter leur susceptibilité à contracter la maladie (Dia et al., 1997 ; Elshafie et al., 2013). Ce résultat rejoint l'étude d'Elshafi qui a rapporté que les femelles sont 2 fois plus affectées que les mâles. Les différences dans les activités des mâles et des femelles peuvent aussi être à l'origine de la variation dans la susceptibilité à l'infection.

Le type d'habitat et l'activité des chevaux n'ont pas été considéré comme des facteurs de risque dans notre étude. Cependant, l'hébergement dans des boxes individuels diminue l'exposition des chevaux au risque de l'infection car ils sont mieux entretenus (suivie sanitaire, vaccination vermifugation, hygiène) et le contact avec les vecteurs et d'autres animaux malades est réduit.

Aucune différence significative n'a été retrouvée en comparant la séroprévalence de *T. evansi* en fonction de la race du cheval contrairement à une étude menée en Malaisie qui a montré une différence significative dans la séropositivité entre les différentes races étudiées (Elshafie et al., 2013).

La zone des Hautes plaines a constitué un facteur de risque ( $P= 0.00001$ ). Ceci peut être due aux conditions climatiques qui diffèrent d'une zone à une autre ce qui influence sur la présence des vecteurs mécaniques. Les pointes d'eau et les denses végétations ont constitués des facteurs de risque pour l'infection à *T. evansi* dans notre étude ( $P< 0.005$ ). Ces conditions sont favorables à la prolifération des tabanides, vecteurs impliqués dans la transmission de *T. evansi* en Afrique du nord (Baldacchino et al., 2014).

Dans notre étude, le contact des animaux avec les dromadaires a été considéré comme étant un véritable facteur de risque. Les animaux ayant un contact avec les dromadaires ont 2.49 plus de chances d'être positifs ( $P=0.013$ ,  $OR=2.49$ ,  $95\% CI= 1.23-5.25\%$ ). Ce résultat pourrait être dû à la transmission du parasite pendant la phase de parasitémie élevée connue chez les dromadaires. Aucune des caractéristiques physiques ou environnementales n'a été démontrée comme facteur de risque pour la séropositivité chez les ânes, dans cette étude. Les ânes sont moins susceptibles à *T. evansi* (Desquesnes et al., 2013).

## 2. Diagnostic de *Trypanosoma evansi*: évaluation et comparaison entre les techniques sérologiques et moléculaires

Le diagnostic clinique n'est qu'à titre indicatif, il ne permet pas un diagnostic d'exactitude. Les signes cliniques ne sont pas pathognomoniques. Il doit être associé à un diagnostic de certitude. Le diagnostic différentiel de la Trypanosomose à *T. evansi* est difficile, une confusion est potentiellement fréquente avec *T. vivax* en Amérique du Sud transmise par voie sanguine et avec *T. equiperdum* en Asie du Sud-Est qui se transmet par voie sexuelle (Monzon et Colman, 1988 ; Reid, 2002 ; Clares et al., 2005).

Les tests de dépistage (ou de diagnostic) constituent des outils indispensables dans la lutte contre les maladies animales réglementées. C'est pour cette raison que l'Organisation Mondiale de la Santé recommande l'utilisation de méthodes qui répondent aux critères ASSURED : **A**bordable, **S**ensible, **S**pécifique, « **U**ser-friendly » ou facile d'utilisation, **R**apide et **R**obuste, « **E**quipment-free » ou ne nécessitant pas d'équipement spécifique, « **D**eliverable to end users » ou utilisable sur le terrain. La détection de *T. evansi* peut se faire par des techniques parasitologiques, sérologiques et moléculaires (OIE, 2018).

Jusqu'à présent, aucune étude n'a été faite sur la comparaison entre les techniques sérologiques et moléculaires pour la détection de *T. evansi* chez diverses espèces de mammifères. D'où un intérêt majeur dans notre étude qui est de comparer entre six méthodes de dépistage (TL, ELISA/VSG RoTat 1.2, ELISA whole Cell lysate, CATT/*T. evansi*, 18S PCR and ITS1 TD PCR) utilisés pour le diagnostic de *T. evansi* chez divers espèces de mammifères.

L'utilisation des tests (seuls ou associés à d'autres critères) comme outils d'aide à la prise de décision sanitaire nécessite l'étude de leurs caractéristiques intrinsèques et la connaissance du contexte épidémiologique dans lequel ils seront utilisés. Lorsqu'aucun test de référence n'est disponible, des méthodes statistiques adaptées doivent être employées pour évaluer la qualité des tests. Dans cette étude, nous avons utilisé l'approche des modèles à classes latentes (LCA: Latent Class Analysis) dans la comparaison des performances des tests sérologiques et moléculaires chez plusieurs espèces de mammifères. Afin d'obtenir un test de référence parmi plusieurs tests et faire une estimation de la sensibilité et la spécificité des tests évalués.

Les modèles à classe latentes combinent différentes sources d'informations recueillis à partir des tests réalisés sur un grand nombre d'individus (Rutjes et al., 2007). Il est indispensable d'avoir des résultats croisés de plusieurs individus pour évaluer les caractéristiques d'un ou de plusieurs nouveaux tests, comparées à celles d'un test déjà connu mais imparfait, ou pour estimer les caractéristiques de plusieurs tests mal connus. Pour ce faire, il est nécessaire de disposer des résultats croisés de plusieurs individus à au moins deux tests. Le test de Cohen kappa a été utilisé pour évaluer la concordance entre les résultats obtenus par les six méthodes de diagnostic. Un coefficient est utilisé pour mesurer la corrélation entre chaque pair de tests de diagnostic (Cohen, 1960).

### **2.1 Comparaison entre les tests sérologiques :**

L'analyse statistique a démontré des corrélations variables entre les tests (entre faible et fort concordance). La TL a été démontré en forte concordance avec l'ELISA/WCL ( $k : 0.725$ ) et le CATT/*T. evansi* ( $k : 0.784$ ), contrairement aux résultats retrouvés au Pakistan et en Ethiopie (Tehseen et al., 2015 ; Birhanu et al., 2015). La TL est le test sérologique le plus spécifique pour la détection des trypanosomes africains (humains et animaux). Du moment que la TL est un test couteux et exige un laboratoire hautement

équipé Le CATT/*T. evansi* est recommandé pour le diagnostic de terrain. L'ELISA peut être réalisé dans des laboratoires moyennement équipés mais le CATT/*T. evansi* reste le teste de terrain le plus commode et le moins couteux ajoutant à cela sa sensibilité et spécificité importantes.

Une concordance modérée a été rapporté entre ELISA/WCL et CATT/*T. evansi* ( $k : 0.599$ ); TL et ELISA/VSG RoTat 1.2 ( $k : 0.565$ ) ; ELISA/WCL et ELISA/VSG Rotat 1.2 ( $k : 0.553$ ). Les résultats des tests ELISA dépendent de l'espèce animale et du contexte épidémiologique de la zone d'étude. Des antigènes d'autres espèces de trypanosomes comme *Trypanosoma equiperdum* et *T.vivax* ou autres agents pathogènes peuvent être détecter en ELISA (Desquesnes, 2017). L'approche des classes latentes a rapporté une sensibilité de 100% pour tous les tests sérologiques et une excellente spécificité 95%. La grande sensibilité des tests sérologiques peut être due à la capacité de ces tests à détecter des anticorps même quelques semaines après le traitement des animaux affectés (Verloo et al., 2000). La TL a présenté une spécificité de 100% comme il a été démontré dans d'autres études (Van Meirvenne et al., 1995; Holland et al., 2002).

## 2.2 Comparaison entre les tests moléculaires

Les deux tests moléculaires sont en forte corrélation ( $k : 0.868$ ), ils ont la même sensibilité (47%) et une excellente spécificité (PCR ITS1: 100 %, PCR 18S: 98 %). Un des tests peut être utilisé pour le diagnostic de *T. evansi* chez un animal suspecté cliniquement ou sérologiquement. Les tests moléculaires ont une faible sensibilité selon l'approche LCA, ceci peut être due à l'élimination rapide de l'ADN parasitaire après le traitement des animaux malades (2 jours) (Desquesnes et al., 1995; Clausen et al., 1999; Desquesnes et al., 2001).

## 2.3 Comparaison entre les tests sérologiques et moléculaires

Six animaux ont été révélé positifs en PCR18S et négatifs en TL et 3 ont été révélé positifs en PCR ITS1 et négatifs en TL. Ce résultat peut être expliqué par l'apparition tardive des anticorps anti *T. evansi* par rapport à la présence de l'ADN détectable en PCR. Une étude expérimentale a rapporté que les anticorps anti *T. evansi* apparait 17 jours après l'infection par contre l'ADN a pu être détecté 5 jours seulement de post infection. (Ramírez-Iglesias et al., 2011). Une étude de Verloo et al (2000) a démontré

que l'ELISA/*T. evansi* et le CATT/*T. evansi* détectent des anticorps anti *T. evansi* en phase aigüe et également en phase chronique de la maladie.

L'absence d'anti corps spécifiques anti *T. evansi* type A chez des individus possédant l'ADN du groupe trypanozoon pouvait être lié à la présence de *Trypanosoma evansi* type B qui ne possède pas le VSG Rotat 1.2 comme il a été démontré dans plusieurs pays africains (Njiru et al., 2006; Birhanu et al., 2015). Une PCR spécifique *T. evansi* type B a été faite sur tous les échantillons de dromadaires et 1 caprin positif en PCR 18S, aucun cas positif n'a été révélé.

## Conclusions générales et recommandations

En conclusion cette thèse de doctorat a montré l'importance des études épidémiologiques sur la trypanosomose due à *T. evansi* chez diverses espèces de mammifères au sud de l'Algérie. Une importance particulière a été donnée au diagnostic du surra : les performances des différentes techniques sérologiques et moléculaires. Il a été démontré que *T. evansi* présente un risque non négligeable dans l'élevage du camelin dans la wilaya de Ghardaïa avec une séroprévalence de 9.3%.

Des mesures sanitaires doivent être prises pour limiter la propagation de la maladie aux zones non enzootiques en tenant compte des facteurs de risque associés à la maladie. Le rôle des réservoirs doit être pris en considération dans les programmes de lutte contre le surra. Quoique dans notre étude de faibles seroprevalence de *T. evansi* ont été rapporté chez les ruminants et les chiens à l'exception d'un seul caprin positif en PCR, cet aspect doit être plus investigué dans le futur avec un échantillon plus large.

Le control du surra en Algérie doit être fait en associant des tests sérologiques et moléculaires. Le diagnostic doit être le plus possible prêt des zones enzootiques. Le seul test commode au terrain est le CATT/*T. evansi* qui devra être un outil de diagnostic de routine a l'apporté des vétérinaires praticiens. Dans un deuxième temps les cas séropositifs doivent être soumis à des tests moléculaires comme la PCR 18S ou PCR ITS1 pour confirmation de la maladie. Les animaux confirmés malades doivent être traité dans l'immédiat. La mobilité des animaux doit être limité entre les zones infectées et non infectés.

Nous avons été limités par quelques obstacles dans les investigations sur des paramètres importants dans l'épidémiologie du surra comme l'effet de la saison et de la densité des vecteurs. Nous n'avons pas pu réaliser des frottis sanguins colorés pour la caractérisation morphologique de *T. evansi*. Le travail de terrain été difficile et c'été pas possible de faire plus de recherches sur place.

Cette étude doctorale est une contribution à nos connaissances sur *Trypaosoma evansi*. Nous souhaitons attirer l'attention des autorités pour lutter contre cette maladie. Le contrôle du surra ne peut se faire sans une bonne connaissance de l'épidémiologie de la maladie, des outils de diagnostic et des traitements appropriés et disponibles sur le marché Algérien.

**Références**

**Bibliographiques**

## Références:

- Adamu, S., Ibrahim, N.D., Nok, A.J., Esiebo, K.A., 2008. Sialyltransferase activity probably counteracts that of sialidase as one of the possible mechanisms of natural recovery or stabilization of erythrocyte mass in trypanosome-infected animals-A perspective. *African Journal of Biotechnology* 7.
- Amer, S., Ryu, O., Tada, C., Fukuda, Y., Inoue, N., Nakai, Y., 2011. Molecular identification and phylogenetic analysis of *Trypanosoma evansi* from dromedary camels (*Camelus dromedarius*) in Egypt, a pilot study. *Acta Trop.* 117, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.09.010>
- Andrianarivo, A.G., Muiya, P., Logan-Henfrey, L.L., 1996. *Trypanosoma congolense*: high erythropoietic potential in infected yearling cattle during the acute phase of the anemia. *Exp. Parasitol.* 82, 104–111. <https://doi.org/10.1006/expr.1996.0014>
- Andrianarivo, A.G., Muiya, P., Opollo, M., Logan-Henfrey, L.L., 1995. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of a primary infection on bone marrow progenitor cells from N'Dama and Boran cattle. *Exp. Parasitol.* 80, 407–418. <https://doi.org/10.1006/expr.1995.1053>
- Antoine-Moussiaux, N., Desmecht, D., 2008. Epidémiologie de l'infection par *Trypanosoma evansi*. *Annales de Médecine Vétérinaire* 152.
- Aquino, L.P.C.T. de, Machado, R.Z., Alessi, A.C., Marques, L.C., Castro, M.B. de, Malheiros, E.B., 1999. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 255–260.
- Aref, M., Yasin, S.M., Bahear, W., Ghulam, Z., Hastie, L., Dennison, T., Schauwers, W., Büscher, P., Deborggraeve, S., 2013. Canine *Trypanosoma evansi* infection in Afghanistan. *Veterinary Parasitology* 197, 638–641. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.016>
- Aregawi, W.G., Agga, G.E., Abdi, R.D., Büscher, P., 2019. Systematic review and meta-analysis on the global distribution, host range, and prevalence of *Trypanosoma evansi*. *Parasites & Vectors* 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3311-4>
- Authié, E., Duvallet, G., Robertson, C., Williams, D.J., 1993. Antibody responses to a 33 kDa cysteine protease of *Trypanosoma congolense*: relationship to

- “trypanotolerance” in cattle. *Parasite Immunol.* 15, 465–474.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1993.tb00632.x>
- Authié, E., Pobel, T., 1990. Serum haemolytic complement activity and C3 levels in bovine trypanosomosis under natural conditions of challenge--early indications of individual susceptibility to disease. *Vet. Parasitol.* 35, 43–59.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(90\)90115-r](https://doi.org/10.1016/0304-4017(90)90115-r)
- Baral, T.N., 2010. Immunobiology of African trypanosomes: need of alternative interventions. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 389153.  
<https://doi.org/10.1155/2010/389153>
- Baral, T.N., De Baetselier, P., Brombacher, F., Magez, S., 2007. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. *J. Infect. Dis.* 195, 1513–1520.  
<https://doi.org/10.1086/515577>
- Barry, J.D., Marcello, L., Morrison, L.J., Read, A.F., Lythgoe, K., Jones, N., Carrington, M., Blandin, G., Böhme, U., Caler, E., Hertz-Fowler, C., Renauld, H., El-Sayed, N., Berriman, M., 2005. What the genome sequence is revealing about trypanosome antigenic variation. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 986–989.  
<https://doi.org/10.1042/BST20050986>
- Benaissa, M.H., Ansel, S., Mohamed-Cherif, A., Benfodil, K., Khelef, D., Youngs, C.R., Kaidi, R., Ait-Oudhia, K., 2017. Seroprevalence and risk factors for *Coxiella burnetii*, the causative agent of Q fever in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) population in Algeria. *Onderstepoort J Vet Res* 84.  
<https://doi.org/10.4102/ojvr.v84i1.1461>
- Benfodil, K., Ansel, S., Mohamed-Cherif, A., Ait-Oudhia, K., 2019. Prevalence of *Trypanosoma evansi* in horses (*Equus caballus*) and donkeys (*Equus asinus*) in El-Bayadh district, southwestern Algeria. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 70, 1631–1638. <https://doi.org/10.12681/jhvms.21786>
- Bennoune, O., Adili, N., Amri, K., Bennecib, L., Ayachi, A., 2013. Trypanosomiasis of camels (*Camelus dromedarius*) in Algeria: First report, in: *Veterinary Research Forum: An International Quarterly Journal*. Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran, p. 273.
- Berlin, D., Loeb, E., Baneth, G., 2009. Disseminated central nervous system disease caused by *Trypanosoma evansi* in a horse. *Vet. Parasitol.* 161, 316–319.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.030>

- Berlin, D., Nasereddin, A., Azmi, K., Ereqat, S., Abdeen, Z., Baneth, G., 2010. Longitudinal study of an outbreak of *Trypanosoma evansi* infection in equids and dromedary camels in Israel. *Veterinary Parasitology* 174, 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.002>
- Berthier, D., Peylhard, M., Dayo, G.-K., Flori, L., Sylla, S., Bolly, S., Sakande, H., Chantal, I., Thevenon, S., 2015. A comparison of phenotypic traits related to trypanotolerance in five west african cattle breeds highlights the value of shorthorn taurine breeds. *PLoS ONE* 10, e0126498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126498>
- Birhanu, H., Fikru, R., Said, M., Kidane, W., Gebrehiwot, T., Hagos, A., Alemu, T., Dawit, T., Berkvens, D., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2015. Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, Northern Ethiopia. *Parasit Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0818-1>
- Boid, R., 1988. Isoenzyme characterisation of 15 stocks of *Trypanosoma evansi* isolated from camels in the Sudan. *Trop. Med. Parasitol.* 39, 45–50.
- Borst, P., Fase-Fowler, F., Gibson, W.C., 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Molecular and biochemical parasitology* 23, 31–38.
- Bosschaerts, T., Guilliams, M., Stijlemans, B., De Baetselier, P., Beschin, A., 2009. Understanding the role of monocytic cells in liver inflammation using parasite infection as a model. *Immunobiology* 214, 737–747. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.06.010>
- Boushaki, D., Adel, A., Dia, M.L., Büscher, P., Madani, H., Brihoum, B.A., Sadaoui, H., Bouayed, N., Kechemir Issad, N., 2019. Epidemiological investigations on *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the South of Algeria. *Heliyon* 5, e02086. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02086>
- Brun, R., Hecker, H., Lun, Z.-R., 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Veterinary Parasitology* 79, 95–107. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00146-0)
- Büscher, P., 2014. Diagnosis of African Trypanosomiasis, in: Magez, S., Radwanska, M. (Eds.), *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer Vienna, Vienna, pp. 189–216. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1556-5_8)
- Büscher, P., Mumba Ngoyi, D., Kaboré, J., Lejon, V., Robays, J., Jamonneau, V., Bebronne, N., Van der Veken, W., Biéler, S., 2009. Improved Models of Mini Anion

- Exchange Centrifugation Technique (mAECT) and Modified Single Centrifugation (MSC) for sleeping sickness diagnosis and staging. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e471. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000471>
- Camara, M., Camara, O., Ilboudo, H., Sakande, H., Kaboré, J., N'Dri, L., Jamonneau, V., Bucheton, B., 2010. Sleeping sickness diagnosis: use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop. Med. Int. Health* 15, 796–799. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x>
- Campigotto, G., Da Silva, A.S., Volpato, A., Balzan, A., Radavelli, W.M., Soldá, N.M., Grosskopf, H.M., Stefani, L.M., Bianchi, A.E., Monteiro, S.G., Tonin, A.A., Weiss, P.H.E., Miletti, L.C., Lopes, S.T.A., 2015. Experimental infection by *Trypanosoma evansi* in sheep: Occurrence of transplacental transmission and mice infection by parasite present in the colostrum and milk of infected ewes. *Vet. Parasitol.* 212, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.07.007>
- Carnes, J., Anupama, A., Balmer, O., Jackson, A., Lewis, M., Brown, R., Cestari, I., Desquesnes, M., Gendrin, C., Hertz-Fowler, C., Imamura, H., Ivens, A., Kořený, L., Lai, D.-H., MacLeod, A., McDermott, S.M., Merritt, C., Monnerat, S., Moon, W., Myler, P., Phan, I., Ramasamy, G., Sivam, D., Lun, Z.-R., Lukeš, J., Stuart, K., Schnauffer, A., 2015. Genome and Phylogenetic Analyses of *Trypanosoma evansi* Reveal Extensive Similarity to *T. brucei* and Multiple Independent Origins for Dyskinetoplasty. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 9, e3404. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003404>
- Carrington, M., Miller, N., Blum, M., Roditi, I., Wiley, D., Turner, M., 1991. Variant specific glycoprotein of *Trypanosoma brucei* consists of two domains each having an independently conserved pattern of cysteine residues. *J. Mol. Biol.* 221, 823–835. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)80178-w](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80178-w)
- Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., Buscher, P., 2005. Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews* 18, 133–146. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.1.133-146.2005>
- Claes, F., Agbo, E.C., Radwanska, M., Te Pas, M.F.W., Baltz, T., De Waal, D.T., Goddeeris, B.M., Claassen, E., Büscher, P., 2003. How does *Trypanosoma equiperdum* fit into the Trypanozoon group? A cluster analysis by RAPD and multiplex-endonuclease genotyping approach. *Parasitology* 126, 425–431. <https://doi.org/10.1017/s0031182003002968>

- Claes, F., Ilgekbayeva, G.D., Verloo, D., Saidouldin, T.S., Geerts, S., Buscher, P., Goddeeris, B.M., 2005. Comparison of serological tests for equine trypanosomosis in naturally infected horses from Kazakhstan. *Veterinary Parasitology* 131, 221–225. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.001>
- Claes, F., Radwanska, M., Urakawa, T., Majiwa, P.A., Goddeeris, B., Büscher, P., 2004. Variable Surface Glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biol Dis* 3, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-3-3>
- Clausen, P.-H., Waiswa, C., Katunguka-Rwakishaya, E., Schares, G., Steuber, S., Mehlitz, D., 1999. Polymerase chain reaction and DNA probe hybridization to assess the efficacy of diminazene treatment in *Trypanosoma brucei*-infected cattle. *Parasitol Res* 85, 206–211. <https://doi.org/10.1007/s004360050536>
- Cnops, J., Magez, S., De Trez, C., 2015. Escape mechanisms of African trypanosomes: why trypanosomosis is keeping us awake. *Parasitology* 142, 417–427. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001838>
- Cohen, J., 1960. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement* 20, 37–46. <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>
- Coppens, I., Levade, T., Courtoy, P.J., 1995. Host Plasma Low Density Lipoprotein Particles as an Essential Source of Lipids for the Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 270, 5736–5741. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.5736>
- Da Silva, A.S., Pierezan, F., Wolkmer, P., Costa, M.M., Oliveiro, C.B., Tonin, A.A., Santurio, J.M., Lopes, S.T.A., Monteiro, S.G., 2010. Pathological findings associated with experimental infection by *Trypanosoma evansi* in cats. *J. Comp. Pathol.* 142, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.10.020>
- Da Silva, A.S., Zanette, R.A., Wolkmer, P., Costa, M.M., Garcia, H.A., Lopes, S.T.A., Santurio, J.M., Teixeira, M.M.G., Monteiro, S.G., 2009. Diminazene aceturate in the control of *Trypanosoma evansi* infection in cats. *Vet. Parasitol.* 165, 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.025>
- Dagnachew, S., Terefe, G., Abebe, G., Barry, D., McCulloch, R., Goddeeris, B., 2015. In vivo experimental drug resistance study in *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. *Acta Trop.* 146, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.014>

- Darji, A., Lucas, R., Magez, S., Torreele, E., Palacios, J., Sileghem, M., Bajyana Songa, E., Hamers, R., De Baetselier, P., 1992. Mechanisms underlying trypanosome-elicited immunosuppression. *Ann Soc Belg Med Trop* 72 Suppl 1, 27–38.
- de Menezes, V.T., Queiroz, A.O., Gomes, M.A.M., Marques, M.A.P., Jansen, A.M., 2004. *Trypanosoma evansi* in inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. *Parasitol. Res.* 94, 193–200. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1207-4>
- de Oliveira Lima, A.N., da Silva Santos, S., Herrera, H.M., Gama, C., Cupolillo, E., Jansen, A.M., Fernandes, O., 2008. *Trypanosoma evansi*: molecular homogeneity as inferred by phenetical analysis of ribosomal internal transcribed spacers DNA of an eclectic parasite. *Exp. Parasitol.* 118, 402–407. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.10.003>
- Deborggraeve, S., Büscher, P., 2012. Recent progress in molecular diagnosis of sleeping sickness. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 12, 719–730. <https://doi.org/10.1586/erm.12.72>
- Deborggraeve, S., Lejon, V., Ekangu, R.A., Mumba Ngoyi, D., Pati Pyana, P., Ilunga, M., Mulunda, J.P., Büscher, P., 2011. Diagnostic accuracy of PCR in gambiense sleeping sickness diagnosis, staging and post-treatment follow-up: a 2-year longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e972. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000972>
- Desquesnes, M., n.d. Standardisations internationale et régionale des épreuves immunoenzymatiques : 15.
- Desquesnes, M., Bossard, G., Patrel, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E., Thevenon, S., Berthier, D., Pavlovic, D., Brugidou, R., Jacquiet, P., Schelcher, F., Faye, B., Touratier, L., Cuny, G., 2008. First outbreak of *Trypanosoma evansi* in camels in metropolitan France. *Vet. Rec.* 162, 750–752. <https://doi.org/10.1136/vr.162.23.750>
- Desquesnes, M., Bossard, G., Thévenon, S., Patrel, D., Ravel, S., Pavlovic, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E., Hollzmuller, P., Berthier, D., Jacquiet, P., Cuny, G., 2009. Development and application of an antibody-ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. *Veterinary Parasitology* 162, 214–220. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.033>

- Desquesnes, M., Bosseno, M.-F., Brenière, S.F., 2007. Detection of Chagas infections using *Trypanosoma evansi* crude antigen demonstrates high cross-reactions with *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Genet. Evol.* 7, 457–462.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.01.007>
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D.-H., Lun, Z.-R., Holzmüller, P., Jittapalpong, S., 2013a. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. *BioMed Research International* 2013, 1–20. <https://doi.org/10.1155/2013/321237>
- Desquesnes, M., Dávila, A.M.R., 2002. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary Parasitology* 109, 213–231. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4)
- Desquesnes, M., (de) La Rocque, S., Peregrine, A.S., 1995. French guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride. *Acta Tropica* 60, 133–136. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(95\)00117-W](https://doi.org/10.1016/0001-706X(95)00117-W)
- Desquesnes, M., Dia, M.L., 2004. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet. Parasitol.* 119, 9–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.015>
- Desquesnes, M., Holzmüller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R., Jittapalpong, S., 2013b. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International* 2013, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>
- Desquesnes, M., Kamyngkird, K., Vergne, T., Sarataphan, N., Pranee, R., Jittapalpong, S., 2011. An evaluation of melarsomine hydrochloride efficacy for parasitological cure in experimental infection of dairy cattle with *Trypanosoma evansi* in Thailand. *Parasitology* 138, 1134–1142.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182011000771>
- Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungrana, A., Dávila, A.M., 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.  
[https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00161-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00161-8)
- Dia, M.L., Diop, C., Aminetou, M., Jacquiet, P., Thiam, A., 1997. Some factors affecting the prevalence of *Trypanosoma evansi* in camels in Mauritania. *Veterinary Parasitology* 72, 111–120. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00054-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00054-X)

- Dn, O., J, H., Ag, L., 1998a. Increase in CD5+ B cells and depression of immune responses in sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet Immunol Immunopathol* 63, 209–222. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(97\)00147-5](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(97)00147-5)
- Dn, O., J, H., Ag, L., 1998b. Proliferative responses of peripheral blood leucocytes of sheep infected with *Trypanosoma evansi*. *Scand J Immunol* 48, 170–176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00354.x>
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., 1991. “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008. <https://doi.org/10.1093/nar/19.14.4008>
- El Rayah, I.E., Kaminsky, R., Schmid, C., El Malik, K.H., 1999. Drug resistance in Sudanese *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 80, 281–287. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00221-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00221-0)
- Elhaig, M.M., Sallam, N.H., 2018. Molecular survey and characterization of *Trypanosoma evansi* in naturally infected camels with suspicion of a Trypanozoon infection in horses by molecular detection in Egypt. *Microbial Pathogenesis* 123, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.017>
- El-Sayed, N.M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S.E., Donelson, J.E., 2000. The African trypanosome genome. *Int. J. Parasitol.* 30, 329–345. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00015-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00015-1)
- Ferenc, S.A., Stopinski, V., Courtney, C.H., 1990. The development of an enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* and its use in a seroepidemiological survey of the Eastern Caribbean Basin. *Int. J. Parasitol.* 20, 51–56. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90172-j](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90172-j)
- Ferguson, M.A., Homans, S.W., Dwek, R.A., Rademacher, T.W., 1988. Glycosylphosphatidylinositol moiety that anchors *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein to the membrane. *Science* 239, 753–759. <https://doi.org/10.1126/science.3340856>
- Fernández, D., González-Baradat, B., Eleizalde, M., González-Marcano, E., Perrone, T., Mendoza, M., 2009. *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Experimental Parasitology* 121, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.09.013>
- Fikru, R., Andualem, Y., Getachew, T., Menten, J., Hasker, E., Merga, B., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2015. Trypanosome infection in dromedary camels in Eastern Ethiopia: Prevalence, relative performance of diagnostic tools and host related risk

- factors. *Veterinary Parasitology* 211, 175–181.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.008>
- Fikru, R., Goddeeris, B.M., Delespaux, V., Moti, Y., Tadesse, A., Bekana, M., Claes, F., De Deken, R., Büscher, P., 2012. Widespread occurrence of *Trypanosoma vivax* in bovines of tsetse- as well as non-tsetse-infested regions of Ethiopia: a reason for concern? *Vet. Parasitol.* 190, 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.010>
- Fikru, R., Hagos, A., Rogé, S., Reyna-Bello, A., Gonzatti, M.I., Merga, B., Goddeeris, B.M., Büscher, P., 2014. A proline racemase based PCR for identification of *Trypanosoma vivax* in cattle blood. *PLoS ONE* 9, e84819.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084819>
- Flynn, J.N., Sileghem, M., 1991. The role of the macrophage in induction of immunosuppression in *Trypanosoma congolense*-infected cattle. *Immunology* 74, 310–316.
- Foil, L.D., 1989. Tabanids as vectors of disease agents. *Parasitology today* 5, 88–96.
- García, H., García, M.-E., Pérez, G., Bethencourt, A., Zerpa, E., Pérez, H., Mendoza-León, A., 2006. Trypanosomiasis in Venezuelan water buffaloes: association of packed-cell volumes with seroprevalence and current trypanosome infection. *Ann Trop Med Parasitol* 100, 297–305. <https://doi.org/10.1179/136485906X91521>
- Geerts, S., Holmes, P.H., Eisler, M.C., Diall, O., 2001. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol.* 17, 25–28.  
[https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(00\)01827-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(00)01827-4)
- Geysen, D., Delespaux, V., Geerts, S., 2003. PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. *Vet. Parasitol.* 110, 171–180. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00313-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00313-8)
- Gibson, W., 2007. Resolution of the species problem in African trypanosomes. *International journal for parasitology* 37, 829–838.
- Gibson, W., 2003. Species concepts for trypanosomes: from morphological to molecular definitions? *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 10. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-10>
- Gibson, W.C., Wilson, A.J., Moloo, S.K., 1983. Characterisation of *Trypanosoma (Trypanozoon) evansi* from camels in Kenya using isoenzyme electrophoresis. *Res. Vet. Sci.* 34, 114–118.
- Gutierrez, C., Corbera, J.A., Juste, M.C., Doreste, F., Morales, I., 2006. Clinical, hematological, and biochemical findings in an outbreak of abortion and neonatal

- mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1081, 325–327. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.044>
- Gutierrez, C., Corbera, J.A., Juste, M.C., Doreste, F., Morales, I., 2005. An outbreak of abortions and high neonatal mortality associated with *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the Canary Islands. Vet. Parasitol. 130, 163–168. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.02.009>
- Gutierrez, C., Desquesnes, M., Touratier, L., Büscher, P., 2010. *Trypanosoma evansi*: recent outbreaks in Europe. Vet. Parasitol. 174, 26–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.012>
- Gutierrez, C., Juste, M.C., Corbera, J.A., Magnus, E., Verloo, D., Montoya, J.A., 2000. Camel trypanosomosis in the Canary Islands: assessment of seroprevalence and infection rates using the card agglutination test (CATT/*T. evansi*) and parasite detection tests. Veterinary Parasitology 90, 155–159. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00225-9)
- Gutiérrez, C., Tamarit, A., González-Martín, M., Tejedor-Junco, M.T., 2014. Control and eventual eradication of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels after an episodic outbreak in mainland Spain: An example in a non-endemic area. Veterinary Parasitology 204, 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.004>
- Habila, N., Inuwa, M.H., Aimola, I.A., Udeh, M.U., Haruna, E., 2012. Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections. Research in veterinary science 93, 13–17.
- Hall, J.P.J., Wang, H., Barry, J.D., 2013. Mosaic VSGs and the scale of *Trypanosoma brucei* antigenic variation. PLoS Pathog. 9, e1003502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003502>
- Hasan, M.U., Muhammad, G., Gutierrez, C., Iqbal, Z., Shakoor, A., Jabbar, A., 2006. Prevalence of *Trypanosoma evansi* Infection in Equines and Camels in the Punjab Region, Pakistan. Annals of the New York Academy of Sciences 1081, 322–324. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.043>
- Helfert, S., Estévez, A.M., Bakker, B., Michels, P., Clayton, C., 2001. Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. Biochem J 357, 117–125.
- Herrera, H.M., Dávila, A.M.R., Norek, A., Abreu, U.G., Souza, S.S., D'Andrea, P.S., Jansen, A.M., 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. Veterinary Parasitology 125, 263–275. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.013>

- Hertz, C.J., Mansfield, J.M., 1999. IFN-gamma-dependent nitric oxide production is not linked to resistance in experimental African trypanosomiasis. *Cell. Immunol.* 192, 24–32. <https://doi.org/10.1006/cimm.1998.1429>
- Hoare, C.A., 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.
- Holland, W.G., Do, T.T., Huong, N.T., Dung, N.T., Thanh, N.G., Vercruyse, J., Goddeeris, B.M., 2003. The effect of *Trypanosoma evansi* infection on pig performance and vaccination against classical swine fever. *Vet. Parasitol.* 111, 115–123. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00363-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00363-1)
- Holland, W.G., My, L.N., Dung, T.V., Thanh, N.G., Tam, P.T., Vercruyse, J., Goddeeris, B.M., 2001. The influence of *T. evansi* infection on the immunoresponsiveness of experimentally infected water buffaloes. *Vet. Parasitol.* 102, 225–234. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00534-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00534-9)
- Holland, W.G., Thanh, N.G., My, L.N., Magnus, E., Verloo, D., Büscher, P., Goddeeris, B., Vercruyse, J., 2002. Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper discs in serological tests for *Trypanosoma evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Tropica* 81, 159–165. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(01\)00211-X](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(01)00211-X)
- Horn, D., 2014. Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 195, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.05.001>
- Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R.W., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E., Steinert, M., 1986. Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature* 322, 173–175. <https://doi.org/10.1038/322173a0>
- Johnson, J.G., Cross, G.A., 1979. Selective cleavage of variant surface glycoproteins from *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* 178, 689–697. <https://doi.org/10.1042/bj1780689>
- Joshi, P.P., Shegokar, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A., Jannin, J., Truc, P., 2005. Human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 73, 491–495.
- 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.
- Kinabo, L.D., 1993. Pharmacology of existing drugs for animal trypanosomiasis. *Acta Trop.* 54, 169–183. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(93\)90091-o](https://doi.org/10.1016/0001-706x(93)90091-o)
- Korbie, D.J., Mattick, J.S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3, 1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>
- 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. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5517-5524.2003>
- Kumar, R., Kumar, S., Khurana, S.K., Yadav, S.C., 2013. Development of an antibody-ELISA for seroprevalence of *Trypanosoma evansi* in equids of North and North-western regions of India. *Veterinary Parasitology* 196, 251–257. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.04.018>
- Laha, R., Sasmal, N.K., 2008. Endemic status of *Trypanosoma evansi* infection in a horse stable of eastern region of India – a field investigation. *Tropical Animal Health and Production* 40, 357–361. <https://doi.org/10.1007/s11250-007-9107-0>
- Lai, D.-H., Hashimi, H., Lun, Z.-R., Ayala, F.J., Lukes, J., 2008. Adaptations of *Trypanosoma brucei* to gradual loss of kinetoplast DNA: *Trypanosoma equiperdum* and *Trypanosoma evansi* are petite mutants of *T. brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 1999–2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711799105>
- Lanham, S.M., Godfrey, D.G., 1970. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology* 28, 521–534. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(70\)90120-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(70)90120-7)
- Leach, T.M., Roberts, C.J., 1981. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of animal trypanosomiasis in the Eastern hemisphere. *Pharmacol. Ther.* 13, 91–147. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(81\)90069-3](https://doi.org/10.1016/0163-7258(81)90069-3)
- Liu, M.K., Pearson, T.W., 1987. Detection of circulating trypanosomal antigens by double antibody ELISA using antibodies to procyclic trypanosomes. *Parasitology* 95 (Pt 2), 277–290. <https://doi.org/10.1017/s0031182000057735>
- Luckins, A.G., 1992. Trypanosomosis in small ruminants--a major constraint to livestock production? *Br. Vet. J.* 148, 471–473. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(92\)90002-I](https://doi.org/10.1016/0007-1935(92)90002-I)

- Luckins, A.G., 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitology Today* 4, 137–142.  
[https://doi.org/10.1016/0169-4758\(88\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0169-4758(88)90188-3)
- Lumsden, W.H., 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. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(79\)90092-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(79)90092-0)
- Lun, Z.R., Brun, R., Gibson, W., 1992. Kinetoplast DNA and molecular karyotypes of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* from China. *Mol. Biochem. Parasitol.* 50, 189–196. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(92\)90215-6](https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90215-6)
- Lun, Z.R., Desser, S.S., 1995. Is the broad range of hosts and geographical distribution of *Trypanosoma evansi* attributable to the loss of maxicircle kinetoplast DNA? *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 11, 131–133. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(95\)80129-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(95)80129-4)
- Lun, Z.-R., Lai, D.-H., Li, F.-J., Lukeš, J., Ayala, F.J., 2010. *Trypanosoma brucei*: two steps to spread out from Africa. *Trends in Parasitology* 26, 424–427.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.05.007>
- Magez, S., Schwegmann, A., Atkinson, R., Claes, F., Drennan, M., De Baetselier, P., Brombacher, F., 2008. The role of B-cells and IgM antibodies in parasitemia, anemia, and VSG switching in *Trypanosoma brucei*-infected mice. *PLoS Pathog.* 4, e1000122. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000122>
- Mansfield, J.M., Paulnock, D.M., 2005. Regulation of innate and acquired immunity in African trypanosomiasis. *Parasite Immunol.* 27, 361–371.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00791.x>
- Marshall, P.B., 1948. The glucose metabolism of *Trypanosoma evansi* and the action of trypanocides. *Br J Pharmacol Chemother* 3, 8–14. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1948.tb00347.x>
- Mäser, P., Lüscher, A., Kaminsky, R., 2003. Drug transport and drug resistance in African trypanosomes. *Drug Resist. Updat.* 6, 281–290.  
<https://doi.org/10.1016/j.drug.2003.09.001>
- Masiga, D.K., Gibson, W.C., 1990. Specific probes for *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* based on kinetoplast DNA minicircles. *Mol. Biochem. Parasitol.* 40, 279–283. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90049-r](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90049-r)
- Masiga, D.K., Ndung'u, K., Tweedie, A., Tait, A., Turner, C.M.R., 2006. *Trypanosoma evansi*: genetic variability detected using amplified restriction fragment length

- polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Kenyan isolates. *Exp. Parasitol.* 114, 147–153.  
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.03.002>
- 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. *International Journal for Parasitology* 22, 909–918. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90047-O](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90047-O)
- Mihok, S., 2002. The development of a multipurpose trap (the Nzi) for tsetse and other biting flies. *Bull. Entomol. Res.* 92, 385–403. <https://doi.org/10.1079/BER2002186>
- Miller, E.N., Allan, L.M., Turner, M.J., 1984. Mapping of antigenic determinants within peptides of a variant surface glycoprotein of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13, 309–322. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(84\)90122-1](https://doi.org/10.1016/0166-6851(84)90122-1)
- Mochabo, M.O.K., Kitale, P.M., Gathura, P.B., Ogara, W.O., Eregae, E.M., Kaitho, T.D., Catley, A., 2006. The socio-economic impact of important camel diseases as perceived by a pastoralist community in Kenya. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 73, 269–274.
- Moloo, S.K., 1978. Excretion of uric acid and amino acids during diuresis in the adult female *Glossina morsitans*. *Acta Trop.* 35, 247–252.
- Monzón, C.M., Mancebo, O.A., Roux, J.P., 1990. Comparison between six parasitological methods for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in the subtropical area of Argentina. *Veterinary Parasitology* 36, 141–146. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(90\)90102-H](https://doi.org/10.1016/0304-4017(90)90102-H)
- Morrison, L.J., Marcello, L., McCulloch, R., 2009. Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cell. Microbiol.* 11, 1724–1734. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01383.x>
- Moti, Y., De Deken, R., Thys, E., Van Den Abbeele, J., Duchateau, L., Delespaux, V., 2015. PCR and microsatellite analysis of diminazene aceturate resistance of bovine trypanosomes correlated to knowledge, attitude and practice of livestock keepers in South-Western Ethiopia. *Acta Trop.* 146, 45–52.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.015>
- Murray, M., Dexter, T.M., 1988. Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review. *Acta Trop.* 45, 389–432.

- Murray, M., Murray, P.K., McIntyre, W.I., 1977. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 325–326. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(77\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0035-9203(77)90110-9)
- Muzari, M.O., Burgess, G.W., Skerratt, L.F., Jones, R.E., Duran, T.L., 2010. Host preferences of tabanid flies based on identification of blood meals by ELISA. *Vet. Parasitol.* 174, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.040>
- Nantulya, V.M., 1994. Suratex: a simple latex agglutination antigen test for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections (surra). *Trop. Med. Parasitol.* 45, 9–12.
- Nantulya, V.M., 1990. Trypanosomiasis in domestic animals: the problems of diagnosis. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 9, 357–367. <https://doi.org/10.20506/rst.9.2.507>
- Narnaware, S.D., Ghorui, S.K., Kumar, S., Patil, N.V., 2016. Vertical transmission of *Trypanosoma evansi* in dromedary camels and studies on fetal pathology, diagnosis and treatment. *Acta Parasitol.* 61, 329–336. <https://doi.org/10.1515/ap-2016-0043>
- Ngaira, J.M., Njagi, E.N.M., Ngeranwa, J.J.N., Olembo, N.K., 2004. PCR amplification of RoTat 1.2 VSG gene in *Trypanosoma evansi* isolates in Kenya. *Veterinary Parasitology* 120, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.12.007>
- Ngaira, J.M., Olembo, N.K., Njagi, E.N.M., Ngeranwa, J.J.N., 2005. The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. *Exp. Parasitol.* 110, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.01.001>
- Ngeranwa, J.J., Gathumbi, P.K., Mutiga, E.R., Agumbah, G.J., 1993. Pathogenesis of *Trypanosoma (brucei) evansi* in small east African goats. *Res. Vet. Sci.* 54, 283–289. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90124-x](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90124-x)
- Ngeranwa, J.J., Mutiga, E.R., Agumbah, G.J., Gathumbi, P.K., Munyua, W.K., 1991. The effects of experimental *Trypanosoma (Trypanozoon) (brucei) evansi* infection on the fertility of male goats. *Vet. Res. Commun.* 15, 301–308. <https://doi.org/10.1007/bf00430035>
- Njiru, Z.K., 2012. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1572. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001572>
- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Gitonga, P.K., Thompson, R.C.A., Reid, S.A., 2007. Genetic variability of *Trypanosoma evansi* isolates detected by inter-simple sequence repeat anchored-PCR and microsatellite. *Vet. Parasitol.* 147, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.010>

- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Masiga, D.K., Reid, S.A., Thompson, R.C.A., Gibson, W.C., 2006. Characterization of *Trypanosoma evansi* type B. Infection, Genetics and Evolution 6, 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2005.08.002>
- Njiru, Z.K., Constantine, C.C., Ndung'u, J.M., Robertson, I., Okaye, S., Thompson, R.C.A., Reid, S.A., 2004. Detection of *Trypanosoma evansi* in camels using PCR and CATT/*T. evansi* tests in Kenya. Veterinary Parasitology 124, 187–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.06.029>
- Njiru, Z.K., Mikosza, A.S.J., Matovu, E., Enyaru, J.C.K., Ouma, J.O., Kibona, S.N., Thompson, R.C.A., Ndung'u, J.M., 2008. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. Int. J. Parasitol. 38, 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.09.006>
- Njiru, Z.K., Ouma, J.O., Enyaru, J.C., Dargantes, A.P., 2010. Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test for detection of *Trypanosoma evansi* strain B. Exp. Parasitol. 125, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.01.017>
- Nok, A.J., Esievo, K.A., Ibrahim, S., Ukoha, A.I., Ikediobi, C.O., 1993. Phospholipase A2 from *Trypanosoma congolense*: characterization and haematological properties. Cell Biochem. Funct. 11, 125–130. <https://doi.org/10.1002/cbf.290110208>
- Np, R., N, B., Se, M., Jd, B., 1999. Predominance of Duplicative VSG Gene Conversion in Antigenic Variation in African Trypanosomes [WWW Document]. Molecular and cellular biology. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.9.5839>
- OIE, 2018. OIE (World Organisation for Animal Health), 2018. *Trypanosoma evansi* Infection (Surra). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.1.21. [WWW Document]. URL [https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/3.01.21\\_TRYPANO\\_SURRA.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.01.21_TRYPANO_SURRA.pdf) (accessed 9.22.19).
- OIE, 2017. OIE (World Organisation for Animal Health), 2017. Recueil des protocoles standardises des techniques de diagnostic des trypanosomoses animales d'origine africaine. Lastaccession date 01 october 2019.
- OIE (Ed.), 2008. OIE (World Organisation for Animal Health), 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6. ed. ed. OIE, Paris.
- OIE - World Organisation for Animal Health, 2008. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 2: Manual of diagnostic

- tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees), 6. ed. ed. OIE, Paris.
- Olaho-Mukani, W., Munyua, W.K., Mutugi, M.W., Njogu, A.R., 1993. Comparison of antibody- and antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections in camels. *Vet. Parasitol.* 45, 231–240. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90078-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90078-2)
- Osir, E.O., Abubakar, L.U., Abakar, M., 1999. The role of trypanolysin in the development of trypanosomes in tsetse.
- Osman, A.S., Jennings, F.W., Holmes, P.H., 1992. The rapid development of drug-resistance by *Trypanosoma evansi* in immunosuppressed mice. *Acta Trop.* 50, 249–257. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90081-8](https://doi.org/10.1016/0001-706x(92)90081-8)
- Otsyula, M., Kamar, K., Mutugi, M., Njogu, A.R., 1992. Preliminary efficacy trial of Cymelarsan, a novel trypanocide, in camels naturally infected with *Trypanosoma evansi* in Kenya. *Acta Trop.* 50, 271–273. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(92\)90084-b](https://doi.org/10.1016/0001-706x(92)90084-b)
- Ou, Y.C., Giroud, C., Baltz, T., 1991. Kinetoplast DNA analysis of four *Trypanosoma evansi* strains. *Mol. Biochem. Parasitol.* 46, 97–102. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90203-i](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90203-i)
- Paris, J., Murray, M., McOdimba, F., 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop.* 39, 307–316.
- Pathak, K.M.L., Khanna, N.D., 1995. Trypanosomosis in Camel (*Camelus Dromedarius*) with Particular Reference to Indian Sub-Continent: A Review. *International Journal of Animal Sciences* 10, 157–157.
- Payne, R.C., Sukanto, I.P., Bazeley, K., Jones, T.W., 1993. The effect of *Trypanosoma evansi* infection on the oestrous cycle of Friesian Holstein heifers. *Vet. Parasitol.* 51, 1–11. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90190-x](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90190-x)
- Payne, R.C., Sukanto, I.P., Djauhari, D., Jones, T.W., 1991. *Trypanosoma evansi* infection in bovine and buffalo calves in Indonesia. *Vet. Parasitol.* 38, 253–256. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(91\)90135-i](https://doi.org/10.1016/0304-4017(91)90135-i)
- Pays, E., Lips, S., Nolan, D., Vanhamme, L., Pérez-Morga, D., 2001. The VSG expression sites of *Trypanosoma brucei*: multipurpose tools for the adaptation of the parasite to mammalian hosts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 1–16. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00242-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00242-0)

- Pays, E., Vanhamme, L., Pérez-Morga, D., 2004. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 369–374.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.05.001>
- Pays, E., Vanhollebeke, B., Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Nolan, D.P., Pérez-Morga, D., 2006. The trypanolytic factor of human serum. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 477–486. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1428>
- Peregrine, A.S., Gray, M.A., Moloo, S.K., 1997. Cross-resistance associated with development of resistance to isometamidium in a clone of *Trypanosoma congolense*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 1604–1606.
- Perry, B.D., 2002. Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty. ILRI (aka ILCA and ILRAD).
- Pholpark, S., Pholpark, M., Polsar, C., Charoenchai, A., Paengpassa, Y., Kashiwazaki, Y., 1999. Influence of *Trypanosoma evansi* infection on milk yield of dairy cattle in northeast Thailand. *Prev. Vet. Med.* 42, 39–44. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(99\)00056-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(99)00056-2)
- Powar, R., Shegokar, V., Joshi, P., Dani, V., Tankhiwale, N., Truc, P., Jannin, J., Bhargava, A., 2006. A rare case of human trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi*. *Indian Journal of Medical Microbiology* 24, 72.  
<https://doi.org/10.4103/0255-0857.19904>
- Queiroz, A.O., Cabello, P.H., Jansen, A.M., 2000. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso--Brazil. *Vet. Parasitol.* 92, 107–118. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00286-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00286-7)
- Raina, A.K., Kumar, R., Rajora, V.S., Sridhar, null, Singh, R.P., 1985. Oral transmission of *Trypanosoma evansi* infection in dogs and mice. *Vet. Parasitol.* 18, 67–69. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(85\)90009-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(85)90009-3)
- Ramírez-Iglesias, J.R., Eleizalde, M.C., Gómez-Piñeres, E., Mendoza, M., 2011. *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Experimental Parasitology* 128, 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.010>
- Reid, S.A., 2002. *Trypanosoma evansi* control and containment in Australasia. *Trends Parasitol.* 18, 219–224. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02250-x](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02250-x)
- Reid, S.A., Copeman, D.B., 2000. Surveys in Papua New Guinea to detect the presence of *Trypanosoma evansi* infection. *Australian veterinary journal* 78, 843–845.

- Rickman, W.J., Cox, H.W., 1983. Trypanosome antigen-antibody complexes and immunoconglutinin interactions in African trypanosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 13, 389–392. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(83\)80046-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(83)80046-0)
- Rjeibi, M.R., Ben Hamida, T., Dalgatova, Z., Mahjoub, T., Rejeb, A., Dridi, W., Gharbi, M., 2015. First report of surra (*Trypanosoma evansi* infection) in a Tunisian dog. *Parasite* 22, 3. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015004>
- Roldán, A., Comini, M.A., Crispo, M., Krauth-Siegel, R.L., 2011. Lipoamide dehydrogenase is essential for both bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* 81, 623–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07721.x>
- Ross, C.A., Barns, A.M., 1996. Alteration to one of three adenosine transporters is associated with resistance to cymelarsan in *Trypanosoma evansi*. *Parasitol. Res.* 82, 183–188. <https://doi.org/10.1007/s004360050092>
- Rutjes, A.W.S., Reitsma, J.B., Coomarasamy, A., Khan, K.S., Bossuyt, P.M.M., 2007. Evaluation of diagnostic tests when there is no gold standard. A review of methods. *Health Technol Assess* 11, iii, ix–51. <https://doi.org/10.3310/hta11500>
- Sacks, D.L., Askonas, B.A., 1980. Trypanosome-induced suppression of anti-parasite responses during experimental African trypanosomiasis. *Eur. J. Immunol.* 10, 971–974. <https://doi.org/10.1002/eji.1830101216>
- Salah, A.A., Robertson, I., Mohamed, A., 2015. Estimating the economic impact of *Trypanosoma evansi* infection on production of camel herds in Somaliland. *Trop Anim Health Prod* 47, 707–714. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0780-0>
- Saleh, M.A., Al-Salahy, M.B., Sanousi, S.A., 2009. Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 162, 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.035>
- Salleme, S., Rjeibi, M.R., Rouatbi, M., Amairia, S., Ben Said, M., Khamassi Khbou, M., Gharbi, M., 2018. Molecular prevalence and phylogenetic analysis of *Theileria annulata* and *Trypanosoma evansi* in cattle in Northern Tunisia. *Vet Med Sci* 4, 17–25. <https://doi.org/10.1002/vms3.79>
- Schnauffer, A., Domingo, G.J., Stuart, K., 2002. Natural and induced dyskinetoplastic trypanosomatids: how to live without mitochondrial DNA. *International Journal for Parasitology* 32, 1071–1084. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00020-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00020-6)
- Schwede, A., Carrington, M., 2010. Bloodstream form Trypanosome plasma membrane proteins: antigenic variation and invariant antigens. *Parasitology* 137, 2029–2039. <https://doi.org/10.1017/S0031182009992034>

- Schwede, A., Jones, N., Engstler, M., Carrington, M., 2011. The VSG C-terminal domain is inaccessible to antibodies on live trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175, 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.11.004>
- Schwede, A., Macleod, O.J.S., MacGregor, P., Carrington, M., 2015. How Does the VSG Coat of Bloodstream Form African Trypanosomes Interact with External Proteins? *PLoS Pathog.* 11, e1005259. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005259>
- Seaman, G.V., Uhlenbruck, G., 1963. The surface structure of erythrocytes from some animal sources. *Arch. Biochem. Biophys.* 100, 493–502. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(63\)90117-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(63)90117-6)
- Seiler, R.J., Omar, S., Jackson, A.R., 1981. Meningoencephalitis in naturally occurring *Trypanosoma evansi* infection (surra) of horses. *Vet. Pathol.* 18, 120–122. <https://doi.org/10.1177/030098588101800114>
- Sileghem, M., Darji, A., De Baetselier, P., 1991. In vitro simulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei*. *Immunology* 73, 246–248.
- Sileghem, M., Darji, A., Hamers, R., De Baetselier, P., 1989. Modulation of IL-1 production and IL-1 release during experimental trypanosome infections. *Immunology* 68, 137–139.
- Simpson, A.G.B., Stevens, J.R., Lukeš, J., 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology* 22, 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.006>
- Singh, B., Kalra, I.S., Gupta, M.P., Nauriyal, D.C., 1993. *Trypanosoma evansi* infection in dogs: seasonal prevalence and chemotherapy. *Vet. Parasitol.* 50, 137–141. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90014-e](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90014-e)
- Sinha, P.K., Mukherjee, G.S., Das, M.S., Lahiri, R.K., 1971. Outbreak of trypanosomiasis evansi amongst tigers and jaguars in the zoological garden, Calcutta. *Indian Vet. J.* 48, 306–310.
- Songa, E.B., Hamers, R., 1988. A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of *Trypanosoma evansi*, in: *Annales de La Société Belge de Médecine Tropicale*. pp. 233–240.
- Songa, E.B., Painsavoine, P., Wittouck, E., Viseshakul, N., Muldermans, S., Steinert, M., Hamers, R., 1990. Evidence for kinetoplast and nuclear DNA homogeneity in *Trypanosoma evansi* isolates. *Mol. Biochem. Parasitol.* 43, 167–179. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(90\)90142-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(90)90142-9)

- Stephens, J.L., Lee, S.H., Paul, K.S., Englund, P.T., 2007. Mitochondrial fatty acid synthesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* 282, 4427–4436.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M609037200>
- Stevens, J.R., Nunes, V.L., Lanham, S.M., Oshiro, E.T., 1989. Isoenzyme characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from capybaras and dogs in Brazil. *Acta Trop.* 46, 213–222. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(89\)90021-1](https://doi.org/10.1016/0001-706x(89)90021-1)
- Stijlemans, B., Guilliams, M., Raes, G., Beschin, A., Magez, S., De Baetselier, P., 2007. African trypanosomiasis: from immune escape and immunopathology to immune intervention. *Vet. Parasitol.* 148, 3–13.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.05.005>
- Stijlemans, B., Vankrunkelsven, A., Brys, L., Magez, S., De Baetselier, P., 2008. Role of iron homeostasis in trypanosomiasis-associated anemia. *Immunobiology* 213, 823–835. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.07.023>
- Stijlemans, B., Vankrunkelsven, A., Caljon, G., Bockstal, V., Guilliams, M., Bosschaerts, T., Beschin, A., Raes, G., Magez, S., De Baetselier, P., 2010. The central role of macrophages in trypanosomiasis-associated anemia: rationale for therapeutical approaches. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 10, 71–82.  
<https://doi.org/10.2174/187153010790827966>
- Sumbria, D., Singla, L.D., Sharma, A., Moudgil, A.D., Bal, M.S., 2014. Equine trypanosomiasis in central and western Punjab: Prevalence, haemato-biochemical response and associated risk factors. *Acta Tropica* 138, 44–50.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.003>
- Tabel, H., Wei, G., Shi, M., 2008. T cells and immunopathogenesis of experimental African trypanosomiasis. *Immunol. Rev.* 225, 128–139.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00675.x>
- Tamarit, A., Gutierrez, C., Arroyo, R., Jimenez, V., Zagalá, G., Bosch, I., Sirvent, J., Alberola, J., Alonso, I., Caballero, C., 2010. *Trypanosoma evansi* infection in mainland Spain. *Veterinary Parasitology* 167, 74–76.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.050>
- Tehseen, S., Jahan, N., Qamar, M.F., Desquesnes, M., Shahzad, M.I., Deborggraeve, S., Büscher, P., 2015. Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasites & Vectors* 8. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1002-3>

- Tejero, F., Roschman-González, A., Perrone-Carmona, T. m., Aso, P. m., 2008. *Trypanosoma evansi*: A quantitative approach to the understanding of the morphometry-hematology relationship throughout experimental murine infections. *The Journal of Protozoology Research* 18, 34–47. [https://doi.org/10.32268/jprotozoolres.18.1\\_34](https://doi.org/10.32268/jprotozoolres.18.1_34)
- Thekisoe, O.M.M., Kuboki, N., Nambota, A., Fujisaki, K., Sugimoto, C., Igarashi, I., Yasuda, J., Inoue, N., 2007. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. *Acta Trop.* 102, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.004>
- Tran, T., Napier, G., Rowan, T., Cordel, C., Labuschagne, M., Delespaux, V., Van Reet, N., Erasmus, H., Joubert, A., Büscher, P., 2014. Development and evaluation of an ITS1 “Touchdown” PCR for assessment of drug efficacy against animal African trypanosomosis. *Veterinary Parasitology* 202, 164–170. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.005>
- Upadhye, S.V., Dhoot, V.M., 2000. Trypanosomiasis in a tiger (*Panthera tigris*). *Zoos’ Print Journal* 15.
- Urakawa, T., Verloo, D., Moens, L., Büscher, P., Majiwa, P.A., 2001. *Trypanosoma evansi*: cloning and expression in *Spodoptera frugiperda* [correction of *fugiperda*] insect cells of the diagnostic antigen RoTat1.2. *Exp. Parasitol.* 99, 181–189. <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4670>
- Van den Bossche, P., Doran, M., Connor, R.J., 2000. An analysis of trypanocidal drug use in the Eastern Province of Zambia. *Acta Trop.* 75, 247–258. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(00\)00059-0](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(00)00059-0)
- Van Meirvenne, N., Magnus, E., Buscher, P., 1995. Evaluation of variant specific trypanolysis tests for serodiagnosis of human infections with *Trypanosoma brucei gambiense*. *Acta Trop.* 60, 189–199. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(95\)00127-z](https://doi.org/10.1016/0001-706x(95)00127-z)
- Van Vinh Chau, N., Buu Chau, L., Desquesnes, M., Herder, S., Phu Huong Lan, N., Campbell, J.I., Van Cuong, N., Yimming, B., Chalermwong, P., Jittapalapong, S., Ramon Franco, J., Tri Tue, N., Rabaa, M.A., Carrique-Mas, J., Pham Thi Thanh, T., Tran Vu Thieu, N., Berto, A., Thi Hoa, N., Van Minh Hoang, N., Canh Tu, N., Khac Chuyen, N., Wills, B., Tinh Hien, T., Thwaites, G.E., Yacoub, S., Baker, S., 2016. A Clinical and Epidemiological Investigation of the First Reported Human Infection With the Zoonotic Parasite *Trypanosoma evansi* in Southeast Asia. *Clinical Infectious Diseases* 62, 1002–1008. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw052>

- Vanhamme, L., Paturiaux-Hanocq, F., Poelvoorde, P., Nolan, D.P., Lins, L., Van Den Abbeele, J., Pays, A., Tebabi, P., Van Xong, H., Jacquet, A., Moguilevsky, N., Dieu, M., Kane, J.P., De Baetselier, P., Brasseur, R., Pays, E., 2003. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 422, 83–87.  
<https://doi.org/10.1038/nature01461>
- Vanhollebeke, B., De Muylder, G., Nielsen, M.J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S.K., Pays, E., 2008. A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* 320, 677–681.  
<https://doi.org/10.1126/science.1156296>
- Vanhollebeke, B., Truc, P., Poelvoorde, P., Pays, A., Joshi, P.P., Katti, R., Jannin, J.G., Pays, E., 2006. Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. *N. Engl. J. Med.* 355, 2752–2756.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa063265>
- Ventura, R.M., Takata, C.S., Silva, R.A., Nunes, V.L., Takeda, G.F., Teixeira, M.M., 2000. Molecular and morphological studies of Brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: the total absence of kDNA in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *J. Parasitol.* 86, 1289–1298.  
[https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1289:MAMSOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1289:MAMSOB]2.0.CO;2)
- Ventura, R.M., Takeda, G.F., Silva, R., Nunes, V.L.B., Buck, G.A., Teixeira, M.M.G., 2002. Genetic relatedness among *Trypanosoma evansi* stocks by random amplification of polymorphic DNA and evaluation of a synapomorphic DNA fragment for species-specific diagnosis. *International journal for parasitology* 32, 53–63.
- Verloo, D., Holland, W., My, L.N., Thanh, N.G., Tam, P.T., Goddeeris, B., Vercruyse, J., Büscher, P., 2000. Comparison of serological tests for *Trypanosoma evansi* natural infections in water buffaloes from north Vietnam. *Veterinary Parasitology* 92, 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00284-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00284-3)
- Verloo, D., Magnus, E., Büscher, P., 2001. General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in *Trypanosoma evansi* isolates from different origin. *Veterinary Parasitology* 97, 185–191. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00412-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00412-5)
- Vickerman, K., 1978. Antigenic variation in trypanosomes. *Nature* 273, 613–617.  
<https://doi.org/10.1038/273613a0>
- Vickerman, K., 1969. On The Surface Coat and Flagellar Adhesion in Trypanosomes. *Journal of Cell Science* 5, 163–193.

- Vincendeau, P., Bouteille, B., 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78, 645–665.  
<https://doi.org/10.1590/s0001-37652006000400004>
- Wells, E.A., 1984. Animal trypanosomiasis in South America. *Preventive Veterinary Medicine* 2, 31–41. [https://doi.org/10.1016/0167-5877\(84\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0167-5877(84)90046-1)
- Williams, D.J., Taylor, K., Newson, J., Gichuki, B., Naessens, J., 1996. The role of anti-variable surface glycoprotein antibody responses in bovine trypanotolerance. *Parasite Immunol.* 18, 209–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-76.x>
- Wolkmer, P., da Silva, A.S., Traesel, C.K., Paim, F.C., Cargnelutti, J.F., Pagnoncelli, M., Picada, M.E., Monteiro, S.G., Lopes, S.T. dos A., 2009. Lipid peroxidation associated with anemia in rats experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Vet. Parasitol.* 165, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.032>
- Woo, P.T., 1970. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta Trop.* 27, 384–386.
- Zayed, A.A., Habeeb, S.M., Allam, N. a. T., Ashry, H.M.Z., Mohamed, A.H.H., Ashour, A.A., Taha, H.A., 2010. A critical comparative study of parasitological and serological differential diagnostic methods of *Trypanosoma evansi* infections in some farm animals in Egypt. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* 8, 633–642.
- Zhou, J., Shen, J., Liao, D., Zhou, Y., Lin, J., 2004. Resistance to drug by different isolates *Trypanosoma evansi* in China. *Acta Trop.* 90, 271–275.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.02.002>
- Zr, L., K, V., 1991. Multinuclear forms in a dyskinetoplastic strain of *Trypanosoma evansi* in mice. *Ann Parasitol Hum Comp* 66, 51–53.  
<https://doi.org/10.1051/parasite/199166251>
- Zweygarth, E., Kaminsky, R., 1990. Evaluation of an arsenical compound (RM 110, mel Cy, Cymelarsan) against susceptible and drug-resistant *Trypanosoma brucei brucei* and *T.b. evansi*. *Trop. Med. Parasitol.* 41, 208–212.

# Annexes

## Annexe I

### Protocol de CATT/*T. evansi*

#### CATT/*T. evansi* (\*)

Serodiagnosis of animal trypanosomiasis  
due to *T. evansi* (Surra)

##### I. PRINCIPLE

Infection with *Trypanosoma evansi* results in production of circulating antibodies against several surface antigens of the parasite. Such antibodies can be demonstrated in the plasma or serum of the infected host by direct agglutination. The CATT-antigen is a freeze dried suspension of purified, fixed and stained bloodstream form trypanosomes expressing a predominant variable antigen type of *Trypanosoma evansi* (RoTat 1.2).

The test is performed on a plastified card. Twenty-five microliter of diluted serum or plasma are mixed with one drop of reconstituted antigen. When antibodies are present in the test sample, trypanosomes agglutinate within 5 minutes rotation at 70 rpm.

(\*) CATT = Card Agglutination Test for Trypanosomiasis

##### II. REAGENTS

- CATT ANTIGEN (2.5 ml / vial)**
  - Freeze dried suspension of purified, fixed and stained trypanosomes of VAT RoTat 1.2
  - Preservative: sodium azide (0.1 %).
  - Storage: refrigerator (+2°C / +8°C) or freezer (-20°C).
- CATT BUFFER (30 ml / vial)**
  - Phosphate buffered saline (pH 7.2).
  - Use for reconstitution of CATT-antigen, positive and negative controls + preparation of sample dilutions.
  - Preservative: sodium azide (0.1%).
  - Storage: refrigerator (+2°C / +8°C). DO NOT FREEZE !
- POSITIVE CONTROL (0.5 ml / vial)**
  - Freeze dried goat antiserum.
  - Preservative: sodium azide (0.1 %).
  - Storage: refrigerator (+2°C / +8°C) or freezer (-20°C).
- NEGATIVE CONTROL (0.5 ml / vial)**
  - Freeze dried solution of bovine albumin.
  - Preservative: sodium azide (0.1 %).
  - Storage: refrigerator (+2°C / +8°C) or freezer (-20°C).

##### III. EXECUTION OF THE TEST

###### 1. Reconstitution of the CATT antigen

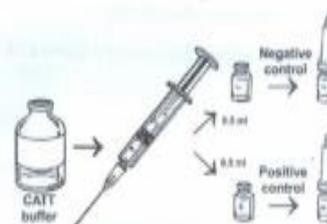
- Using the syringe, add 2.5 ml of CATT buffer to a vial of freeze dried CATT antigen.
- Immediately shake the vial for a few seconds so as to obtain homogeneous suspension.
- Put a dropper on the vial.
- The antigen suspension is ready for use.

Notes: 1. Before each use, shake the vial for a few seconds.  
2. Keep the CATT antigen out of the sun and dust.



###### 2. Reconstitution of the controls

- Using the syringe, add 0.5 ml of CATT buffer to a vial of the positive and the negative control. Put a dropper on each vial.



Note: After reconstitution of each vial of CATT antigen, test one drop of the positive control and one drop of the negative control to check the quality of the antigen.

###### 3. Preparation of test samples

- 3.1. Screening test on diluted serum or plasma**
  - Prepare a 1:4 or 1:8 dilution in CATT BUFFER

Note: For each animal species tested, the optimal test conditions i.e. screening (threshold) dilution as well as sensitivity and specificity should be determined.

Using a micropipette, put 25 µl of diluted serum or plasma in a test area on the card

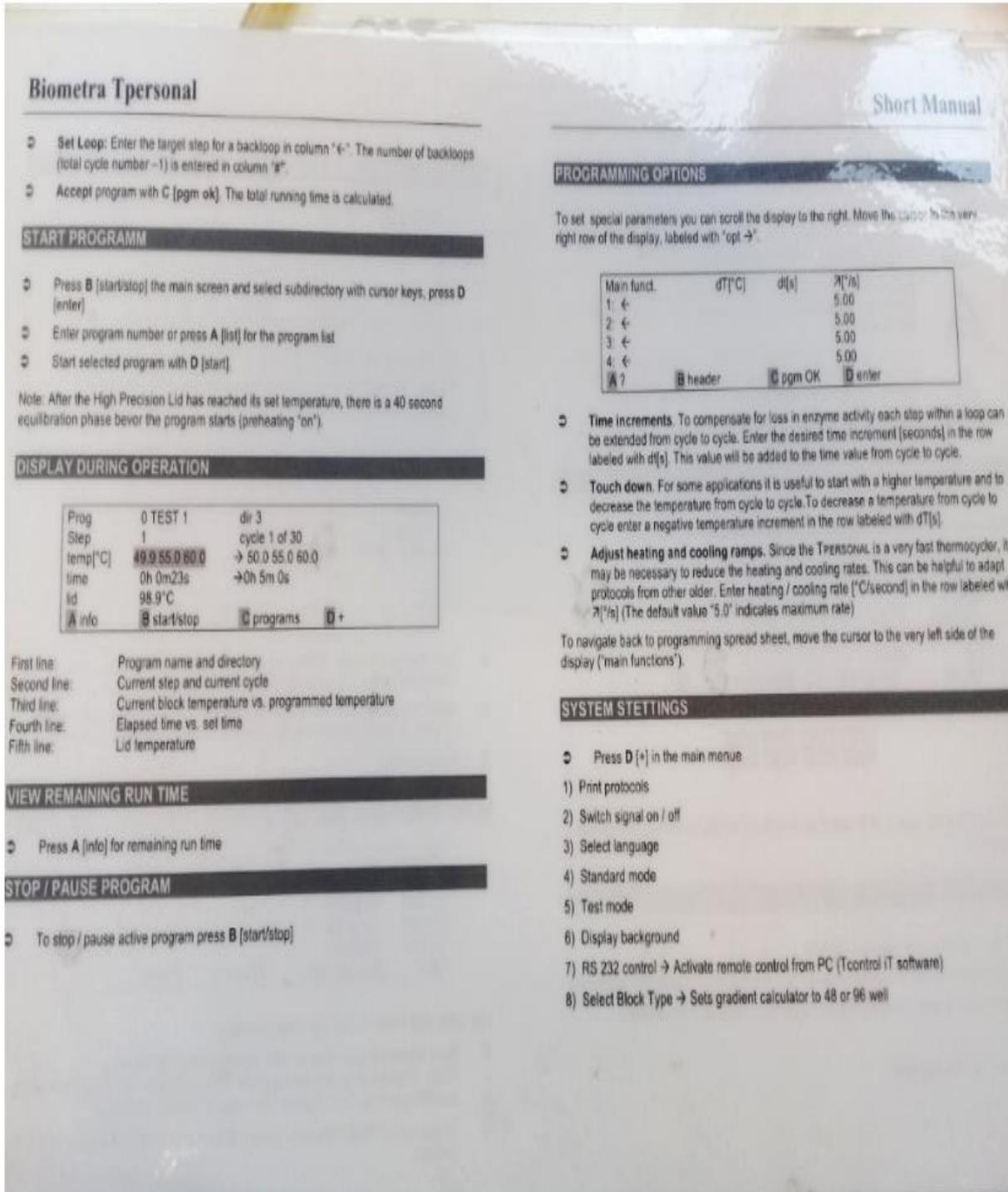
###### 3.2. Quantitative method (titration)

- Prepare serial twofold dilutions 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 and 1:64 of the test sample in CATT BUFFER.

Using a micropipette, put 25 µl of each dilution in a test area on the card

## Annexe II

### Manuel du thermo-cycler



### Annexe III

## Fiche D'enquête

Dr. Benfodil Karima  
Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire  
Alger.

Wilaya:  
Daïra :  
Commune :

#### PRELEVEMENT

N° du prélèvement :  
Date du Prélèvement :  
Nature du prélèvement :

#### PROPRIETAIRE

Nom et prénom :  
Adresse :  
N° de tel/Fax :  
E-mail :

#### CARACTERISTIQUES PHYSIQUES DE L'ANIMAL

Nom :

Age :

Race :

Sexe : Male Femelle

#### CARACTERISTIQUES DE L'ENVIRONNEMENT

Etat général	Amaigrissement	Cachexie	Prostration	Hyperthermie
--------------	----------------	----------	-------------	--------------

Activité :

Habitat : Boxe Pré Etable

Présence de points  
d'eaux Oui Non

Présence de végétation Oui Non

Promiscuité avec le  
dromadaire Oui Non

#### STATUT SANITAIRE

Vaccination Rage Tétanos

Vermifugation

Intervention  
chirurgicale

#### MANIFESTATIONS CLINIQUES

Etat général	Amaigrissement	Cachexie	Prostration	Hyperthermie
--------------	----------------	----------	-------------	--------------

Troubles sanguins : Anémie Ictère

Troubles nerveux : Convulsion Ataxie Paralyse Autres.....

Troubles de la  
reproduction: Présence d'avortement Absence d'avortement

Autres :