

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

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

Dias Aprita Dewi<sup>1\*</sup>, Fitriane Ekawasti<sup>2</sup>, April H. Wardhana<sup>2</sup>, Dyah H. Sawitri<sup>2</sup>

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

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

### ARTICLE INFO

Received: 24 November 2019

Accepted: 30 Desember 2019

\*Corresponding author

diasaprita@pertanian.go.id

### Keywords:

Mice

PCR

primer

*Trypanosoma evansi*

### ABSTRACT

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

### ABSTRAK

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

### Kata Kunci:

Mencit

PCR

Primer

*Trypanosoma evansi*

## 1. Pendahuluan

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

*T. evansi* mempunyai inang yang beragam dari hewan liar sampai hewan domestik yang mempunyai nilai ekonomi yang penting dengan berbagai tingkat kerentanan yang berbeda. Diantara hewan domestik yang rentan adalah kuda, sapi, kerbau, kambing, domba, babi, anjing, dan kucing, sedangkan hewan liar yang rentan diantaranya adalah badak (Anderson et al., 2011), rusa (Adrian, Sani, Hassan, & Wong, 2010), wallaby (Thompson, Godfrey, & Thompson, 2014) dan bisa berpotensi sebagai sumber infeksi untuk hewan domestik (N'Djetchi et al., 2017). Hewan coba seperti tikus dan mencit juga sangat peka terhadap infeksi *T. evansi* (OIE, 2008). Inokulasi pada mencit (*mouse inoculation*) sebagai salah satu hewan coba yang sensitif terhadap surra merupakan metode yang sensitif untuk mendeteksi penyakit surra kronis dan sudah banyak dibuktikan oleh para ahli (Ndungu et al., 2019; Villagran-Herrera et al., 2018). Inokulasi pada mencit dapat dipakai untuk propagasi *T. evansi* untuk keperluan penelitian lebih lanjut seperti uji PCR untuk deteksi dan identifikasi *T. evansi*.

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

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

primer yang sesuai (Musaya et al., 2017; Ramirez-Iglesias, Eleizalde, Reyna-Bello, & Mendoza, 2017).

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

DNA untuk teknik PCR dapat diekstraksi dari sampel darah dan organ. Sampel darah dapat berupa darah segar maupun darah kering. Kertas saring sebagai media darah kering dapat diperiksa menggunakan PCR untuk mendeteksi DNA *T. evansi*. Penggunaan kertas saring selain lebih cepat dan nyaman, pengiriman sampel darah menjadi lebih mudah terutama di daerah terpencil (Dargantes, 2010; Desquesnes et al., 2013; Wuryastuti, Wasito, & Putro, 2016).

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

## 2. Materi dan Metode

### 2.1. Isolat *Trypanosoma evansi*

Isolat *T. evansi* diperoleh dari *Balivvet Culture Collection* (BBC) dengan nomor P0 176. Isolat tersebut dikoleksi dari darah kerbau pada tahun 1988 di Kabupaten Bangkalan, Madura, provinsi

Jawa Timur dan disimpan di dalam kriopreservasi nitrogen cair.

## 2.2. Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah seekor mencit DDY jantan berumur 2 – 3 bulan dengan bobot badan 25 – 30 g. Hewan tersebut diadaptasikan selama 10 hari dan diterapi dengan obat cacing, antibiotik dan anti protozoa. Selama masa penelitian, hewan coba diberi pakan pelet komersial dan minum secara *ad libitum*. Sekam sebagai alas kandang (*litter*) diautoklaf terlebih dahulu agar bebas dari kontaminan biologis lainnya.

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

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

## 2.4. Koleksi Organ Hewan Coba

Seekor hewan coba dinekropsi dan spesimen organ dikoleksi, antara lain otak, hati,

paru, jantung, limpa dan ginjal. Masing-masing organ dimasukkan ke dalam kontainer plastik yang berisi ethanol 80 %.

## 2.5. Ekstraksi DNA

### 2.5.1. Ekstraksi DNA sampel Organ

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

### 2.5.2. Aplikasi Uji PCR

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

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

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

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

Hasil produk PCR dari fragmen-fragmen DNA yang diamplifikasi dengan primer-primer yang berbeda kemudian dielektroforesis pada gel *agarose* 1,5 % selama 30 menit pada 100 volt. Pita DNA yang terbentuk diamati di atas UV *transilluminator*.

## 3. Hasil dan Pembahasan

Isolat *T. evansi* yang digunakan pada penelitian ini telah diuji patogenitasnya dan tergolong kedalam kelompok isolat yang patogen karena mampu membunuh hewan coba kurang dari satu minggu. Kematian yang disebabkan oleh isolat ini juga cenderung serentak pasca puncak tingkat parasitemia, berbeda dengan isolat non patogen yang memiliki profil parasitemia yang fluktuatif. Isolat Bangkalan dipilih sebagai isolat *T. evansi* yang diuji molekuler pada penelitian ini karena karakteristiknya yang seragam pada hewan coba.

Hasil uji PCR pada pada ketiga jenis sampel sediaan yang mengandung *T. evansi* dengan berbagai macam primer dapat dilihat pada Tabel 2. Seluruh sampel dapat teramplifikasi dengan baik meskipun menggunakan kondisi PCR yang sama. Perbedaan diantara hasil produk terletak dari ketebalan pita DNA yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan konsentrasi pada masing-masing ekstrak genom DNA berbeda (Gambar 1).

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

Jenis Spesimen	ITS 1	RoTat 1.2 VSG	TBR 1/2	ESAG 6/7
Organ	Otak	+	+	+
	Hati	+	+	+
	Paru	+	+	+
	Jantung	+	+	+
	Limpa	+	+	+
	Ginjal	+	+	+
		+	+	+
		+	+	+
		+	+	+
		+	+	+

Pita DNA dari fragmen DNA dengan primer ITS 1 terletak di posisi 480 bp. Desquesnes et al. (2013) melaporkan bahwa primer ITS 1 mampu mengidentifikasi beberapa spesies *Trypanosoma* karena memiliki variasi ukuran untuk spesies tertentu. Panjang produk PCR ITS1 pada beberapa spesies *Trypanosoma* antara lain 700 bp untuk *T. congolense savannah*, 400 bp untuk *T. simiae*, 250 bp untuk *T. vivax* dan 480 bp untuk *T. evansi*. Ukuran panjang fragmen ITS 1 *T. evansi* sama dengan ukuran fragmen DNA *T. brucei sub spesies* (Sawitri et al., 2015). Primer ini telah banyak digunakan untuk studi molekuler epidemiologi pada trypanosomiasis Afrika yang patogen (Salim et al., 2011). Primer ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan primer yang lain, yaitu dapat menggambarkan produk PCR yang berbeda apabila dalam sebuah sampel terjadi dua atau lebih spesies *Trypanosoma* yang menginfeksi ternak. Njiru et al. (2011) menyatakan bahwa primer ITS 1 mampu

mengidentifikasi spesies *Trypanosoma* secara simultan pada sampel yang diinfeksi dengan lebih dari satu jenis *Trypanosoma*. Di Afrika Selatan primer ini mampu mengidentifikasi adanya multiinfeksi beberapa spesies *Trypanosoma* pada kerbau dan sapi (Kajunguri et al., 2014) sehingga dapat menekan biaya diagnosis dan memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan primer tunggal untuk satu jenis *Trypanosoma*.

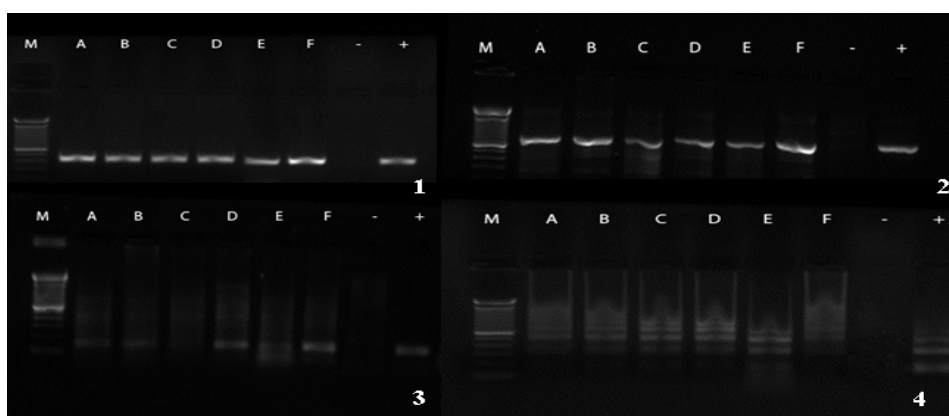
Hasil yang sama juga dijumpai pada sampel yang diamplifikasi dengan primer ESAG 6/7. Pita DNA terletak pada posisi 740 bp. Primer ESAG 6/7 juga memberikan hasil produk PCR yang bagus yang ditandai dengan adanya visualisasi pita DNA dengan intensitas yang jelas (740 bp) pada seluruh organ yang diuji.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

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

Primer Ro Tat 1,2 VSG adalah jenis varian primer yang hanya dimiliki oleh *T. evansi* (Sawitri et al., 2015). Primer ini mampu membedakan *T. evansi* dari *T. brucei*. Menurut Devi et al. (2018)

bahwa dalam keadaan normal seluruh *T. evansi* mengekspresikan gen RoTat 1,2 VSG. Pengujian PCR spesifik untuk *T. evansi* dengan menggunakan Rotat 1.2 VSG memiliki ukuran 151 bp (Boushaki et al., 2019). Namun primer ini tidak selalu memberikan hasil yang memuaskan. Salim et al. (2011) melaporkan bahwa primer RoTat 1,2 VSG hanya mampu mendeteksi 13 sampel dari 30 sampel darah unta yang mengandung *T. evansi* di Sudan. Hasil yang sama juga diperoleh dari penelitian Devi et al. (2018) yang mendapatkan hasil negatif pada beberapa sampel dari darah kuda gurun di India. Studi lebih lanjut menunjukkan bahwa *T. evansi* yang berasal dari Kenya

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



Gambar 1. Pita DNA *T. evansi* dari sampel organ mencit yang diamplifikasi dengan berbagai macam primer. 1: Primer ITS 1 (480 bp); 2: Primer ESAG 6/7 (740 bp); 3: Primer RoTat 1,2 VSG (151 bp) dan 4: Primer TBR1/2 (164 bp); M: Marker, -: Kontrol negatif; + : Kontrol positif (480 bp). A: Otak; B: Hati; C: Paru; D: Jantung; E: Limpa; F: Ginjal.

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

al. (2017) bahwa primer TBR1/2 tidak menyebabkan reaksi silang dengan *T. vivax* dan mampu mendeteksi *T. evansi* dari inang yang berbeda-beda di daerah Venezuela.

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

#### 4. Kesimpulan

Primer yang digunakan dalam penelitian ini (ITS1, ESAG 6/7, RoTat 1.2 VSG, dan TBR1/2) mampu mendeteksi *T. evansi* pada semua organ

mencit yang diinfeksi *T. evansi*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sensitivitas primer terhadap sampel organ yang diuji pada berbagai rentang waktu pasca diinfeksi.

# Daftar Pustaka

- Adrian, M. S., Sani, R. A., Hassan, L., & Wong, M. T. (2010). Outbreaks of trypanosomiasis and the seroprevalence of *T. evansi* in a deer breeding centre in Perak, Malaysia. *Tropical Animal Health and Production*, 42(2), 145–150. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9406-8>
- Ahmed, H. A., Picozzi, K., Welburn, S. C., & MacLeod, E. T. (2013). A comparative evaluation of PCR-based methods for species-specific determination of African animal trypanosomes in Ugandan cattle. *Parasites & Vectors*, 6(316), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-316>
- Anderson, N. E., Mubanga, J., Fevre, E. M., Picozzi, K., Eisler, M. C., Thomas, R., & Welburn, S. C. (2011). Characterisation of the wildlife reservoir community for human and animal trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1211.
- Ashour, A. A., Abou El-Naga, T. R., Barghash, S. M., & Salama, M. S. (2013). *Trypanosoma evansi*: detection of *Trypanosoma evansi* DNA in naturally and experimentally infected animals using TBR<sub>1</sub> & TBR<sub>2</sub> primers. *Experimental Parasitology*, 134(1), 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.02.003>
- Baticados, W. N., Fernandez, C. P., & Baticados, A. M. (2011). Molecular detection of *Trypanosoma evansi* in cattle from Quirino Province, Philippines. *Veterinarski Arhiv*, 81(5), 635–646.
- Behour, T. S., Aboelhadid, S. M., Mousa, W. M., Amin, A. S., & El-Ashram, S. A. (2019). Molecular diagnosis of acute and chronic infection of *Trypanosoma evansi* in experimental male and female mice. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 86(1), 1–10. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v86i1.1638>
- Boushaki, D., Adel, A., Dia, M. L., Büscher, P., Madani, H., Brihoum, B. A., ... Kechemir Issad, N. (2019). Epidemiological investigations on *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels in the South of Algeria. *Heliyon*, 5(7), e02086. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02086>
- Dargantes, A. (2010). *Epidemiology, control and potential insect vectors of Trypanosoma evansi (surra) in village livestock in southern Philippines*. Murdoch University.
- Desquesnes, M., Dargantes, A., Lai, D.-H., Lun, Z.-R., Holzmüller, P., & Jittapalapong, S. (2013). *Trypanosoma evansi* and surra: a review and perspectives on transmission, epidemiology and control, impact, and zoonotic aspects. *BioMed Research International*, 2013(321237), 1–20.
- Devi, A., Shanker, D., Sudan, V., Jaiswal, A., Singh, A., & Chaudhary, M. K. (2018). Phylogenetic studies on RoTat 1.2 VSG of *Trypanosoma evansi* isolate from semi arid India. *Indian Journal of Animal Sciences*, 88(2), 150–152.
- Isobe, T., Holmes, E. C., & Rudenko, G. (2003). The transferrin receptor genes of *Trypanosoma equiperdum* are less diverse in their transferrin binding site than those of the broad-host range *Trypanosoma brucei*. *Journal of Molecular Evolution*, 56(4), 377–386. <https://doi.org/10.1007/s00239-002-2408-z>
- Kajunguri, D., Hargrove, J. W., Ouifki, R., Mugisha, J. Y. T., Coleman, P. G., & Welburn, S. C. (2014). Modelling the use of insecticide-treated cattle to control tsetse and *Trypanosoma brucei rhodesiense* in a multi-host population. *Bulletin of Mathematical Biology*, 76(3), 673–696. <https://doi.org/10.1007/s11538-014-9938-6>
- Kariuki, C. K., Stijlemans, B., & Magez, S. (2019). The Trypanosomal transferrin receptor of *Trypanosoma brucei* - A review. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(4), 126. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4040126>
- 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(7), 909–918. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(92\)90047-O](https://doi.org/10.1016/0020-7519(92)90047-O)
- Musaya, J., Chisi, J., Senga, E., Nambala, P., Maganga, E., Matovu, E., & Enyaru, J. (2017). Polymerase chain reaction identification of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in wild tsetse flies from

- Nkhotakota Wildlife Reserve, Malawi. *Malawi Medical Journal*, 29(1), 11–15.
- N'Djetchi, M. K., Ilboudo, H., Koffi, M., Kaboré, J., Kaboré, J. W., Kaba, D., ... Jamonneau, V. (2017). The study of trypanosome species circulating in domestic animals in two human African trypanosomiasis foci of Côte d'Ivoire identifies pigs and cattle as potential reservoirs of *Trypanosoma brucei gambiense*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005993>
- Ndungu, K., Thungu, D., Wamwiri, F., Mireji, P., Ngae, G., Gitonga, P., ... Thuita, J. (2019). Route of inoculation influences *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* virulence in Swiss white mice. *PloS ONE*, 14(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218441>
- Njiru, Z. K., Constantine, C. C., Guya, S., Crowther, J., Kiragu, J. M., Thompson, R. C. A., & Dávila, A. M. R. (2005). The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitology Research*, 95(3), 186–192. <https://doi.org/10.1007/s00436-004-1267-5>
- Njiru, Z. K., Traub, R., Ouma, J. O., Enyaru, J. C., & Matovu, E. (2011). Detection of Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(4), 1530–1536. <https://doi.org/10.1128/JCM.01817-10>
- OIE. (2008). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (5th ed.). Paris, France: Office International des Epizooties.
- Pruvot, M., Kamyngkird, K., Desquesnes, M., Sarataphan, N., & Jittapalpong, S. (2010). A comparison of six primer sets for detection of *Trypanosoma evansi* by polymerase chain reaction in rodents and Thai livestock. *Veterinary Parasitology*, 171(3–4), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.001>
- 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. *Journal of Parasitic Diseases*, 41(2), 450–458.
- Salim, B., Bakheit, M. A., Kamau, J., Nakamura, I., & Sugimoto, C. (2011). Molecular epidemiology of camel trypanosomiasis based on ITS1 rDNA and RoTat 1.2 VSG gene in the Sudan. *Parasites & Vectors*, 4(31), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-31>
- Sawitri, D. H., & Wardhana, A. H. (2018). Genetic variability of ESAG6/7 gene *Trypanosoma evansi*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 22(1), 38–50. <https://doi.org/10.14334/jitv.v22i1.1638>
- Sawitri, D. H., Wardhana, A. H., Wibowo, H., Sadikin, M., & Ekawasti, F. (2015). Molecular identification technique of *Trypanosoma evansi* by multiplex polymerase chain reaction. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 20(4), 297–307. <https://doi.org/10.14334/jitv.v20i4.1248>
- Stadhouders, R., Pas, S. D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T. H. M., & Schutten, M. (2010). The effect of primer-template mismatches on the detection and quantification of nucleic acids using the 5' nuclease assay. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(1), 109–117. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090035>
- Symula, R. E., Beadell, J. S., Sistrom, M., Agbebakun, K., Balmer, O., Gibson, W., ... Caccone, A. (2012). *Trypanosoma brucei gambiense* Group 1 is distinguished by a unique amino acid substitution in the HpHb receptor implicated in human serum resistance. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7), e1728. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001728>
- Thompson, C. K., Godfrey, S. S., & Thompson, R. C. A. (2014). Trypanosomes of Australian mammals: A review. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(2), 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.02.002>
- Villagran-Herrera, M. E., Martínez-Ibarra, J. A., Sánchez-Moreno, M., Hernández-Montiel, H. L., Mercado-Curiel, R. F., Camacho-Calderón, N., & de Diego-Cabrera, J. A. (2018). The Mouse Model as A Tool for Histological, Immunological and Parasitological Studies of *Trypanosoma cruzi* Infection. In *Chagas Disease-Basic Investigations and Challenges*. IntechOpen.
- Wuryastuti, H., Wasito, R., & Putro, P. P. (2016). Detection of bovine viral diarrhoea virus from blood samples collected using Flinders Technology Associates™ cards.

*Jurnal Veteriner*, 17(2), 176–182. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.2.176>