

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA



EPIDEMIOLOGÍA DE LA TRIPANOSOMIASIS HUMANA AFRICANA EN
LOS FOCOS HISTÓRICOS DE GUINEA ECUATORIAL Y
APROXIMACIÓN TRASLACIONAL A LA EXISTENCIA DE
RESERVORIOS ANIMALES

TESIS DOCTORAL DE:

CARLOS CORDÓN OBRAS

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**JORGE CANO ORTEGA
AGUSTÍN BENITO LLANES
MIGUEL NAVARRO CARRETERO**

Madrid, 2013



Departamento de Zoología y Antropología Física

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Complutense de Madrid

**Epidemiología de la Tripanosomiasis Humana
Africana en los focos históricos de Guinea
Ecuatorial y aproximación traslacional a la
existencia de reservorios animales**

Carlos Cordon Obras

Tesis Doctoral

2012-2013

Epidemiología de la Tripanosomiasis Humana Africana en los focos históricos de Guinea Ecuatorial y aproximación traslacional a la existencia de reservorios animales

Memoria presentada por el licenciado Carlos Córdón Obras para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Dirigida por el Dr. Jorge Cano Ortega de la *London School of Hygiene and Tropical Medicine* (Londres, Reino Unido), el Dr. Agustín Benito Llanes del Centro Nacional de Medicina Tropical (ISCIII) y por el Dr. Miguel Navarro Carretero del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC).

El doctorando V^oB^o del director V^oB^o del director V^oB^o del director

Carlos Córdón Agustín Benito Jorge Cano Miguel Navarro

Agradecimientos

No podría dejar pasar por alto esta oportunidad de expresar mi agradecimiento al primer hombre (o mujer) que se planteó un pensamiento científico. Dio el primer paso de un camino infinito y, aunque no pasó a la historia, es grande la deuda que nuestra especie tiene para con él. A sus sucesores, que levantaron la vista al cielo y se preguntaron; a los siguientes, que clavaron su mirada en el suelo y se preguntaron, a los que vinieron después, mucho después, que se miraron a sí mismos y se preguntaron, de dónde, a dónde, qué, cuándo y sobre todo, por qué. Ellos lucharon contra su propio tiempo, atrapados en las cristalinas celdas de la ortodoxia y el misticismo, endebles y transparentes para la mente inquieta, inquebrantables para la narcotizada percepción que tanto tiempo gobernó, y aún lo hace en parte, los márgenes de este sendero.

Hoy, milenios o siglos después, mis agradecimientos personales pueden parecer nimios, pero no podría ignorar, aunque quisiera, a todos los que me acompañaron durante estos años, mientras acometía una de las tareas que marcarán mi vida para siempre.

En primer lugar, agradezco al Dr. Jorge Cano por contagiarme el entusiasmo por la epidemiología de campo y darme la oportunidad de continuar por su mismo camino. También por su incansable dedicación y apoyo, incluso en la distancia. Ahora estás en Londres, pero a nosotros siempre nos quedará Liverpool.

Al Dr. Agustín Benito, por ayudarme a iniciar mi trabajo en el ciencia y facilitar mi formación en otros centros.

Al Dr. Miguel Navarro, por permitirme trabajar en su laboratorio y enseñarme tantas cosas. Por transformar a un zoólogo en un biólogo molecular.

A la gente del CNMT, por ayudarme a dar mis primeros pasos como investigador, especialmente a Mari Flori (ve rompiendo el cerdito que voy a enviar otro PLoS).

A los compañeros del Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis y del Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial, por su acogida y apoyo. Un recuerdo especial a “Nico” (Nicolás Ndong-Mabale), que me enseñó como trabajar en el terreno.

A mis compañeros del 102, Diana, Isa, Jean-Mathieu, Barqui, Sofía, Manu y Domi, por acogerme y aceptar con resignación, durante varios años, mi carácter excéntrico (que por otra parte me hace tan encantador) sin recurrir excesivamente a la violencia.

A la gente del López Neyra, demasiados nombres para una lista completa, mención especial para Kiko, María Morell, Bea, Poto, Talia, David Commander, Mariascen, Jaime y Eguz y Eze Lannister, y su joven heredero.

A mis mejores amigos, Santi y Miguel, por permanecer igual, a pesar del paso de los años. A Noe, por no poner impedimentos a que parasite su casa cuando me dejo caer por Madrid.

Como olvidarme de mi *pequeña gordisú*, ella me ha sufrido más que nadie y lo seguirá haciendo por muchos años, ya sea arrebuados con un batín en el sofá o viajando con un país en la mochila.

A Suri, cánida divinidad, por existir y hacérmelo saber.

Y a mis padres, Elena y Rafael, por darlo todo por mí desde el inicio, por concederme las oportunidades que hacen que pueda defender esta tesis. Su trabajo ha sido muy duro, mucho más que el que yo presento hoy aquí.

- ¿Un hombre puede ser valiente cuando tiene miedo?
- Es el único momento en que puede ser valiente.

Bran y Ned Stark

George R. R. Martin

Juego de Tronos

Todos los animales son iguales,
pero unos son más iguales que otros.

George Orwell

Rebelión en la granja

Después de este largo recorrido hemos llegado al final del camino,
y el final del camino es la conciencia del largo camino recorrido hasta aquí.

TABLA DE CONTENIDOS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS	11
REACTIVOS Y SOLUCIONES	15
RESUMEN	17
ABSTRACT	22
INTRODUCCIÓN GENERAL	27
1. Taxonomía	27
2. Estructura y ciclo vital	30
2.1 <u>Morfología y fisiología de los subgéneros de <i>Trypanosoma</i> sp.</u>	32
3. Hospedadores	35
4. Tripanosomiasis humana africana	40
4.1 <u>Etiología y Clínica</u>	40
4.2 <u>Diagnóstico y tratamiento</u>	41
4.3 <u>Epidemiología y control</u>	44
4.4 <u>Aspectos moleculares de la epidemiología de la THA</u>	47
5. Tripanosomiasis humana en Guinea Ecuatorial	51
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	57
1. Objetivos generales	57
2. Objetivos específicos	57
3. Hipótesis	57
DISCUSIÓN INTEGRADORA	61
1. Tripanosomas animales y humanos	61
2. Vector	65
3. Reservorios animales	69
4. Mecanismos moleculares implicados en la adaptación de <i>T. b. gambiense</i> a diferentes hospedadores	72
4.1 <u>Crecimiento</u>	72
4.2 <u>Implicación de los sitios de expresión de la VSG</u>	73
4.3 <u>Genotipaje de ESAGs 6 y 7</u>	75
4.4 <u>Incorporación de transferrina</u>	76

4.5. <u>Genotipaje de ESAG3</u>	77
4.6. <u>Plasticidad en los sitios de expresión</u>	80
4.7. <u>Eficiencia de los sueros para la adaptación para el crecimiento de <i>T. b. gambiense</i></u>	81
CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS	91
CAPÍTULO I. Presencia de <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> en el ganado peridoméstico de los focos de Kogo y Mbini	115
CAPÍTULO II. <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> en el ciclo epidemiológico de Luba, un foco sin casos endémicos desde 1995	125
CAPÍTULO III. Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la adaptación de <i>Trypanosoma brucei gambiense</i> a diferentes hospedadores	135

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN	- Ácido desoxirribonucleico
AECID	- Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo.
AFLP	- <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo en el tamaño de los fragmentos amplificados)
APOL1	- Apolipoproteína L1
ARN	- Ácido ribonucleico
BES	- <i>Bloodstream Expression Site</i> (Sitio de expresión de la forma sanguínea)
cADN	- ADN codificante.
CATT	- <i>Card Agglutination Test for Trypanosomiasis</i> (Test de aglutinación en tarjeta para la tripanosomiasis)
CIATT	- <i>Card Indirect Agglutination Test for Trypanosomiasis</i> (Test de aglutinación indirecta en tarjeta para tripanosomiasis)
DA	- Densidad Aparente
DAPI	- 4',6-diamidino-2-fenilindol
DDW	- <i>Double Distilled Water</i> (Agua bidestilada)
DFMO	- Difluorometilornitina
DMSO	- Dimetil Sulfoxido
dNTP	- Deoxynucleótidos fosfato
DTT	- Ditiotreitól
EDTA	- <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilendiaminotetracético)
EGTA	- <i>Ethyleneglycoltetraacetic Acid</i> (Ácido etilenglicoltetracético)
ELISA	- <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima)
ESAG	- <i>Expression Site Associated Gene</i> (Gen asociado al sitio de expresión)
GPI	- <i>Glycophosphatidylinositol</i> (Glicofosfatidilinositol)
GPS	- <i>Global Positioning System</i> (Sistema de posicionamiento global)
Hb	- Hemoglobina
Hp	- Haptoglobina
Hpr	- <i>Haptoglobin related protein</i> (Proteína relacionada con la haptoglobina)
IPTG	- Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Tripanosomiasis humana y reservorios animales

LAMP	- <i>Loop-mediated Isothermal Amplification</i> (amplificación mediada por bucle en condiciones isoterma)
LCA	- Línea Celular Adaptada
LCR	- Líquido Cefalorraquídeo
mAECT	- <i>mini-Anion Exchange Centrifugation Technique</i> (Centrifugación de intercambio aniónico)
mHCT	- <i>micro-Hematocrit Centrifugation Technique</i> (Centrifugación en tubo capilar)
MINSABS	- Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial
OCEAC	- <i>Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale</i> (Organización de coordinación para la lucha contra las endemias en África Central)
OMS	- Organización Mundial de la Salud
Pb	- Pares de bases
PBS	- <i>Phosphate Saline Buffer</i> (Tampón fosfato salino)
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PMFP	- <i>Peptid Mass FingerPrint</i> (Huella de masa peptídica)
PMSF	- <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo)
PNCTHA	- Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis Humana Africana
QBC	- <i>Quantitative Buffy Coat</i> (<i>Buffy coat</i> cuantitativo)
RAPD	- <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico)
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
RIME	- <i>Repetitive Insertion Mobile Element</i> (Elemento móvil de inserción repetitiva)
SBF	- Suero bovino fetal
SDS	- <i>Sodium dodecyl sulfate</i> (Dodecil Sulfato Sódico)
SL	- <i>Spliced Leader</i> (Iniciador de ensamblaje)
SNC	- Sistema Nervioso Central
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de nucleótido único)
SRA	- <i>Serum Resistance Associated gene</i> (Gen asociado a la resistencia al suero)

TAR	- <i>Transformation Associated Recombination</i> (Recombinación asociada a la transformación)
TDB	- <i>Trypanosome Dilution Buffer</i> (Tampón de dilución de tripanosomas)
TDBG	- <i>Trypanosome Dilution Buffer Glucose</i> (Tampón de dilución de tripanosomas con glucosa)
TbHpHbR	- <i>Trypanosoma brucei Haptoglobin-Hemoglobin Receptor</i> (Receptor de Haptoglobina-Hemoglobina de <i>Trypanosoma brucei</i>)
TfR	- Receptor de transferrina
TgsGP	- <i>Trypanosoma gambiense specific GlycoProtein</i> (Glicoproteína específica de <i>Trypanosoma gambiense</i>)
THA	- Tripanosomiasis Humana Africana
TLF	- <i>Trypanolytic Factor</i> (Factor tripanolítico)
UTR	- <i>Untranslated Region</i> (Región no traducida)
VSG	- <i>Variant Surface Glycoprotein</i> (Glicoproteína variable de superficie)

REACTIVOS Y SOLUCIONES

Nombre	Composición
Azul de Coomassie	Coomasie Brilliant Blue R-250 –BioRad- 0,25% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v)
LB	NaCl 86 mM, 10 mg/ml bactotripton, 5 mg/ml extracto de levadura
Medio de congelación células SP2	92% SBF, 8% DMSO
Medio de congelación tripanosomas	HMI9 (IMDM –Sigma- 1,77 % -p/v-, NaHCO ₃ 36 mM, hipoxantina 1 mM, timidina 161 mM, cisteína 1,5 mM, batocuproína 78 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 2 μM, pH 7,5), 10-20% suero indicado, 20% glicerol
Medio de cultivo células SP2	RPMI 1640, 2mM glutamina, 50 μg/ml gentamicina, 10% SBF
Medio de cultivo para hibridomas	RPMI 1640, 20% SBF, 50 μg/ml concentración final gentamicina, 2 mM glutamina, 1 x HT (Hipoxantina Timidina)
Medio de cultivo Tripanosomas	HMI9 (IMDM –Sigma- 1,77 % -p/v-, NaHCO ₃ 36 mM, hipoxantina 1 mM, timidina 161 mM, cisteína 1,5 mM, batocuproína 78 mM, piruvato sódico 1 mM, β-mercaptoetanol 2 μM, pH 7,5), 10-20% suero indicado
Medio de fusión para hibridomas	RPMI 1640, 20% SBF, 50 μg/ml gentamicina, 2 mM glutamina, 1 x HAT (Hipoxantina Aminopterina Timidina)
Medio descongelación y lavado células SP2	RPMI 1640, 2mM glutamina, 50 μg/ml gentamicina
P1	Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 10 mM, RNasa A 100 μg/ml
P2	NaOH 200 mM, SDS 1%
P3	AcK 3M pH 5,5
PBS	NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na ₂ HPO ₄ 10 mM; KH ₂ PO ₄ 1,8 mM, pH 7,4

Tripanosomiasis humana y reservorios animales

Nombre	Composición
Solución de decoloración de Coomassie	Metanol 40% (v/v), ácido acético 7% (v/v)
Tampón de carga de proteínas (2x)	Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 2 mg/ml, glicerol 20 % (v/v), DTT 200 mM
Tampón de elución de proteínas	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M NaCl, 100-250 mM imidazol
Tampón de Lavado de proteínas	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, 1% Tween 20
Tampón de Lisis de proteínas	20 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,5 M NaCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM EGTA, lisozima 100 µg/ml, 20 mM imidazol y 1% Tween 20
Tampón EA	10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 0,5% NP40
Tampón EB	10 mM Tris-HCl pH 8, 250 mM NaCl, 10 mM EDTA y 0,5% SDS (p/v)
Tampón elución ADN	Tris-HCl 10 mM, pH 8
TDB	KCl 5 mM, NaCl 80 mM, MgSO ₄ 1 mM, Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaH ₂ PO ₄ 2mM, pH 7,4
TDBG	KCl 5 mM, NaCl 80 mM, MgSO ₄ 1 mM, Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaH ₂ PO ₄ 2mM, glucosa 20 mM, pH 7,4

RESUMEN

Introducción

La Tripanosomiasis Humana Africana (THA) o enfermedad del sueño es una parasitosis endémica de la franja intertropical del continente africano. Está causada por dos subespecies del protozoo flagelado *Trypanosoma brucei*: *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, que se transmiten mediante la picadura de la mosca tsetse (*Glossina* sp), su único vector conocido (Gibson 2007). Durante el siglo XX ha habido tres grandes epidemias de tripanosomiasis africana, provocando millones de muertos en África Central, seguidas por periodos de baja prevalencia como consecuencia del intenso control que se efectuó sobre la enfermedad (Steverding 2008). Aunque en los últimos años se ha registrado un significativo descenso en la incidencia de casos en la mayor parte de países endémicos, la historia nos ha enseñado que el abandono de las actividades de control conlleva la reaparición de la infección y la extensión hacia áreas donde la enfermedad no estaba presente.

La infección por *T. b. gambiense*, responsable de más del 90% de los casos, es considerada una antroponosis, por lo que las medidas de actuación se dirigen, fundamentalmente, a reducir la incidencia de casos humanos y, en menor medida, a prevenir el contacto con el vector (WHO 2010). Estas estrategias han resultado altamente efectivas desde su inicio, lográndose una reducción drástica en la incidencia de la enfermedad del sueño a escala global. Sin embargo, la completa eliminación del parásito ha sido raramente conseguida en los focos históricos conocidos. Esta situación ha sido atribuida a diversos fenómenos; como el movimiento poblacional, tanto del vector como del reservorio humano y/o animal, la presencia de portadores asintomáticos o a las limitaciones inherentes a los métodos de diagnóstico disponibles en la actualidad (Courtin *et al.* 2008; Koffi *et al.* 2006; Louis *et al.* 2008).

Otros autores sugieren que la fauna local podría tener un papel determinante en el mantenimiento de la transmisión en situaciones de hipo-endemicidad. Esta hipótesis vendría avalada, por un lado, por las numerosas referencias existentes en la literatura sobre la presencia de *T. b. gambiense* en animales tanto domésticos como salvajes de varios focos y, por otro lado, por ciertos modelos matemáticos que predicen la desaparición de la enfermedad en presencia de actividades de control intensas y

periódicas, considerando únicamente al hombre como reservorio (Funk *et al.* 2013; Herder *et al.* 2002; Mehlitz 1986; Njiokou *et al.* 2006; Njiokou *et al.* 2010; Rogers 1988).

A pesar de haberse demostrado la presencia de *T. b. gambiense* en animales, existe muy poca información sobre la persistencia de dichas infecciones y los mecanismos que permitirían al parásito sobrevivir y proliferar en las diversas especies de hospedadores. La bibliografía sobre la adaptación de *T. b. brucei* a diferentes mamíferos apunta a la implicación de los sitios de expresión (BESs) en este proceso (Gerrits *et al.* 2002; Pays *et al.* 2001). En ellos, la proteína variable de superficie (VSG) es co-transcrita con genes asociados a los sitios de expresión (ESAGs) en una unidad policistrónica situada en el telómero, lugar de gran plasticidad genética (Berriman *et al.* 2002). Esta estructura génica tiene además la peculiaridad de la expresión mono-alélica, es decir, que solamente uno de los BESs, de los 15-20 que se estima que existen en *T. brucei*, es expresado, mientras los otros permanecerían reprimidos (Borst *et al.* 1996; Cross *et al.* 1998). El BES expresado (activo) puede ser inactivado en cualquier momento mientras otro nuevo sitio es activado, proceso que es conocido como *switch in situ*. Esto conlleva el cambio de la VSG en la superficie del parásito y la expresión de un nuevo grupo de ESAGs. No obstante, los fenómenos de recombinación también son frecuentes entre los BESs y puede haber cambios en la VSG sin alterar la expresión de todos los ESAGs y viceversa. Se especula que la diversidad alélica observada para ciertos ESAGs de los diferentes BESs puede tener relevancia en la adaptación de los parásitos a su posible abanico de hospedadores (Pays *et al.* 2001). En *T. b. gambiense*, nunca se han llevado a cabo estudios similares de adaptación en otros mamíferos, siendo particularmente interesante dada la controversia que existe sobre su carácter marcadamente antroponótico y la posibilidad de su mantenimiento en reservorios animales en focos hipo-endémicos y/o en fase de eliminación.

Objetivos

El objetivo general de esta tesis es determinar la importancia epidemiológica de los reservorios animales en el mantenimiento de la transmisión de la THA en Guinea Ecuatorial y analizar los mecanismos moleculares que median la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores.

Resultados

En el foco de Luba se demostró la presencia de *T. b. gambiense* en el vector, a pesar de no registrarse casos humanos desde 1995 (Simarro *et al.* 2006), lo que sugiere la persistencia del parásito en un ciclo animal. Los datos entomológicos apuntaron a la zona más occidental del foco como área de mayor riesgo de transmisión y potencial rebrote del foco, al haberse detectado en esa zona las densidades de población vectora más altas y haberse encontrado al parásito en mosca tsetse. En los focos continentales, los resultados sugirieron la existencia de diferentes ciclos epidemiológicos según la ubicación geográfica. En Kogo, donde se registró una prevalencia significativamente inferior de *T. brucei* s.l. y no se detectó *T. b. gambiense* en animales domésticos, tendría lugar una transmisión principalmente ligada a la actividad pesquera en zonas distantes a los núcleos de población, mientras que en Mbini, con mayor tasa de infección por *T. brucei* s.l. y con un 2% de prevalencia de *T. b. gambiense* en el ganado, podría estar manteniéndose un ciclo de transmisión peri-doméstica. Datos entomológicos previos relativos a la distribución de las especies de mosca tsetse en estos focos apoyarían esta teoría (Cano *et al.* 2007a; Cano *et al.* 2007b). En Kogo y Mbini se observó, asimismo, una prevalencia baja de otros tripanosomas animales, en contraste con otros focos de la sub-región. La abundancia y distribución de las diferentes especies de mosca tsetse encontradas en estos focos puede ser relevante para explicar estos resultados divergentes.

Mediante análisis *in vitro*, se estudió la adaptabilidad de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores y los mecanismos moleculares implicados. Para ello, empleamos la cepa ELIANE de *T. b. gambiense* y la adaptamos a los sueros bovino, caprino, porcino y humano, consiguiendo Líneas Celulares Adaptadas (LCAs) específicas a cada suero tras una serie de ciclos de crecimiento (25 pasajes). Se observó que estos cultivos pueden mantenerse de manera virtualmente indefinida en los sueros indicados. Para valorar si esta adaptación podía tener relación con cambios en el BES activo se elaboraron anticuerpos (monoclonales y policlonales) frente a la VSG original (mantenida en suero bovino) y la VSG expresada por la primera LCA de suero humano. Con esta herramienta fue posible determinar que la adaptación a diferentes sueros conllevó, en casi todos los casos, un cambio en la VSG de la superficie del parásito. La VSG

expresada fue independiente del suero específico de adaptación, aunque la tendencia al cambio de la proteína de superficie en la mayoría de las LCAs seguía indicando posibles reordenamientos en los BESs y sugiriendo la implicación de algunos ESAGs. Para comprobar la expresión diferencial de los ESAGs en las LCAs se extrajo ARN de cada una de ellas y se amplificó del cADN correspondiente los ESAGs 6, 7 y 3 expresados. Se seleccionaron estos genes siguiendo varios criterios: los ESAGs 6 y 7 son los únicos cuya función está claramente determinada, codifican para el receptor de transferrina (Steverding 2000), han sido relacionados con la adaptación en *T. b. brucei* por su polimorfismo alélico (Gerrits *et al.* 2002) y son los más próximos al promotor del BES, lo que habilita una transcripción residual incluso desde otros sitios inactivos. Este fenómeno ha sido observado cuando *T. b. brucei* fue expuesto a suero canino y se considera como un mecanismo inmediato de compensación, facilitando la expresión de receptores de transferrina de mayor afinidad cuando el parásito cambia de hospedador (Ansorge *et al.* 1999). La función de ESAG3 no se conoce, aunque cuenta con un péptido señal que parece conducirlo a la membrana plasmática. Así, se piensa que podría jugar un rol en la interacción del parásito con ligandos del hospedador (Pays *et al.* 2001). Además, está presente en casi todos los BESs (Hertz-Fowler *et al.* 2008) y lo bastante lejos del promotor como para hacer improbable su transcripción residual desde BESs inactivos.

Los resultados mostraron una clara selección genotípica de los ESAGs 7 y 3 en los sueros humano y porcino, mientras que las LCAs de suero caprino demostraron una gran diversidad genotípica sin ninguna preferencia por un alelo concreto, lo que puede ser indicativo de una adaptación incompleta (Ansorge *et al.* 1999; van Luenen *et al.* 2005). En lo que respecta a ESAG6 no hubo una asociación con ningún suero específico y a nivel de aminoácido prácticamente todas las líneas expresaron el mismo alelo, lo que parece indicar la baja variabilidad de este gen, descrita con anterioridad (Young *et al.* 2008). Tampoco se observó una relación consistente entre los genotipos de ESAG y la VSG expresada en las LCAs, lo que sugiere que las asociaciones con sueros específicos son el resultado de recombinaciones y no de *switch in situ*. La plasticidad de los BESs, principalmente bajo condiciones de adaptación, ha sido demostrada en *T. b. brucei*, donde se observó que podía regularse la expresión de ESAG7 de varias maneras; eliminando la copia correspondiente del BES activo y aumentando la expresión de las copias procedentes de BESs inactivos, mediante un *switch in situ*, reemplazando el gen por una copia de otro BES o una combinación de ellas (van Luenen *et al.* 2005).

Otros experimentos realizados en este estudio sugieren una mayor dificultad de *T. b. gambiense* para adaptarse al suero de cabra. En primer lugar las LCAs de suero porcino y humano mostraron un significativo descenso en su tiempo de duplicación después del proceso de adaptación, algo que no se observó en las LCAs de suero caprino. Los niveles de expresión de ARN mensajero de los ESAGs 6 y 7 fueron hasta 20 veces mayores en LCAs caprinas respecto al control bovino y, sin embargo, esto no se tradujo en una mayor captación de transferrina. Por el contrario, las LCAs de suero humano y porcino mostraron un 60% más de incorporación media de transferrina que el control bovino y las LCAs caprinas. Estos datos sugieren que el parásito tiene una mejor adaptación en los sueros humano y porcino, mientras que su adaptación en suero caprino conllevaría una transcripción alterada y no regulada de varios sitios de expresión simultáneos, sin conseguir con ello una mayor eficiencia en el crecimiento ni en la captación de transferrina. La mayor idoneidad del suero porcino en la adaptación del parásito apoya los datos epidemiológicos previos que señalan a este animal como principal candidato a actuar como reservorio animal de *T. b. gambiense* (Mehlitz 1986; Penchenier *et al.* 1997; Simo *et al.* 2006).

Conclusiones

Nuestros datos demuestran que *T. b. gambiense* puede mantenerse en la fauna doméstica, tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que podría permitir al parásito permanecer “oculto” desde un punto de vista epidemiológico a las medidas de control centradas en el reservorio humano. Aunque el cerdo se perfila como el principal candidato a actuar como reservorio, el crecimiento del parásito en todos los sueros testados hace que no podamos descartar otros hospedadores animales como potenciales reservorios. Así pues, a pesar de los esfuerzos desplegados por las autoridades locales para controlar la enfermedad, cualquier intento de erradicar la THA en los focos endémicos podría verse comprometido por la existencia de reservorios no humanos.

ABSTRACT

Introduction

Human African Trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is a parasitosis endemic of the inter-tropical African area. It is caused by two subspecies of protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*, both transmitted by tsetse fly (*Glossina* sp.), their only known vector (Gibson 2007). In twentieth century, three important epidemic episodes devastated Central Africa causing millions of deaths, followed by low-prevalence periods as consequence of the targeting intense control on the disease (Steverding 2008). Despite a significant decrease in the incidence recently reported in most of endemic countries, the history shows that the neglect of control activities leads to the rise of new outbreaks and the spread of disease to previously free HAT areas. *T. b. gambiense* infection, responsible for more than 90% of cases, is considered an anthroponosis. Therefore, control measures are mainly focused on reducing human cases and, in lesser extent, to prevent the human-vector contact (WHO 2010). These strategies have shown to be highly effective since their establishment, and they have led to a dramatic drop of disease incidence at global scale. However, the total elimination of parasite has rarely been reported in historical foci of HAT to date. This situation could be attributed to different factors such as population movements, either vector or reservoirs, the existence of asymptomatic carriers or inherent limitations regarding the screening methods currently available (Courtin *et al.* 2008; Koffi *et al.* 2006; Louis *et al.* 2008).

Other authors suggested that local fauna might play a crucial role in the maintenance of transmission under hypo-endemic situations. This hypothesis is strongly supported by several references in the literature about the presence of *T. b. gambiense* in wild and domestic animals and some mathematical models, which predict the sleeping sickness elimination under sustained and intense control activities dismissing the contribution of animal reservoirs in the maintenance of transmission (Funk *et al.* 2013; Herder *et al.* 2002; Mehlitz 1986; Njiokou *et al.* 2006; Njiokou *et al.* 2010; Rogers 1988).

Despite the *T. b. gambiense* presence in fauna has been widely proved, few information regarding the persistence of such infection and molecular mechanisms involved in

parasite survival and proliferation in different host species is available. Extensive literature about *T. b. brucei* adaptation to different mammalian species points out the implication of Bloodstream Expression Sites (BESs) in this process (Gerrits *et al.* 2002; Pays *et al.* 2001). In these sites, the variant surface glycoprotein (VSG) is co-transcribed along with expression site associated genes (ESAGs) in a polycistronic unit located in the telomere, characterized by a high genetic plasticity (Berriman *et al.* 2002). The mono-allelic expression, another special feature of this structure, enables a single BES to be expressed whereas the rest (15-20 BESs are estimated to be within *T. brucei* genome) remains repressed (Borst *et al.* 1996; Cross *et al.* 1998). The active BES can be repressed at any time and another one activated, process known as *in situ* switch. This entails the change of the expressed VSG in the parasite surface and the expression of a new set of ESAGs. However, recombination events are also common between BESs and variations in expressed VSG can occur without altering all ESAGs expression and vice versa. Some authors argued whether allelic diversity of some ESAGs in different BESs could have important effects in parasite adaptation to its host repertoire (Pays *et al.* 2001). Similar studies have never been carried out in *T. b. gambiense*. Thus, it would be especially relevant to clarify whether local fauna might be playing a role in the maintenance of transmission in hypo-endemic or controlled foci, despite the markedly anthroponotic character usually attributed to this parasite.

Objectives

The main aim of this thesis is to determine the epidemiological relevance of animal reservoirs in the persistence of HAT transmission in Equatorial Guinea and to analyze the molecular mechanisms involved in the adaptation of *T. b. gambiense* to different host species.

Results

In Luba focus the presence of *T. b. gambiense* was shown in the vector, despite the fact that no human cases have been reported since 1995 (Simarro *et al.* 2006). That would suggest the persistence of the parasite in a non-human cycle. The highest apparent density of tsetse fly population and an infected glossina were found out in the southwest

of Luba, pointing out this area as at high risk for HAT transmission and resurgence of the disease. In mainland foci, the results obtained suggest the existence of various epidemiological cycles in relation to the geographic location. In Kogo, where *T. brucei* s.l. prevalence turned out to be low and no *T. b. gambiense* infection was detected in livestock, HAT transmission would mostly be linked to fishing activity in areas far away from villages. Instead, a peri-domestic transmission cycle could be maintained in Mbini focus, where higher *T. brucei* s.l. infection rate and 2% of domestic livestock were infected by *T. b. gambiense*. Previous entomological studies showed the highest apparent densities of tsetse fly populations in fishing areas and surrounding water points to villages in Kogo and Mbini respectively, thereby supporting our hypothesis about various transmission cycles (Cano *et al.* 2007a; Cano *et al.* 2007b). In addition, a low prevalence of other animal trypanosomes was also observed in mainland foci, in contrast to other nearby foci from Gabon and Cameroon. The variation in relative abundance and circulating species of tsetse flies could be relevant to explain these divergent results.

T. b. gambiense adaptability to different hosts and molecular mechanisms involved were studied by *in vitro* analysis. *T. b. gambiense* ELIANE strain was exposed and adapted to calf, goat, pig and human sera, developing Adapted Cell Lines (ACLs) to specific sera after 25 passages in culture. Our experiments showed that ACLs can be maintained indefinitely in the aforementioned sera. Antibodies were developed against VSG of original line (maintained in bovine serum) and VSG expressed by the first ACL from human serum to assess whether this adaptation might be related to genetic changes in active BES. This tool enabled us to determine that the adaptation of *T. b. gambiense* mostly entailed a change in the VSG of the parasite surface. The expressed VSG was independent of the specific animal sera, although the trend to switch the surface protein in most ACLs would still indicate possible rearrangements in BESs suggesting the implication of some ESAGs. We extracted RNA from each cell line and amplified from corresponding cDNA the expressed ESAGs 6, 7 and 3 to check their differential allelic expression in ACLs. Selection of these genes was performed following some criteria: ESAGs 6 and 7 are the only ones whose function is well-known, they codify the transferrin receptor (Steverding 2000), have been linked to adaptation in *T. b. brucei* because of their high degree of allelic polymorphism (Gerrits *et al.* 2002) and they are close to BES promoter, enabling them to be residually expressed from inactive BESs. The latter feature has been observed when *T. b. brucei* was exposed to canine serum and

it has been considered as an instant compensation mechanism which would allow the parasite to express higher affinity transferrin receptor when passes to another host (Ansorge *et al.* 1999). ESAG3 function is unknown, although it has a signal peptide that seems to lead it to the plasmatic membrane of the parasite, which might be indicative of a role in interaction with host ligands (Pays *et al.* 2001). Besides, it is present in most of BESs (Hertz-Fowler *et al.* 2008) and far enough from the promoter to make unlikely the residual transcription from inactive BESs.

Results showed a clear genotypic selection of ESAGs 7 and 3 in human and pig sera, whereas ACLs of goat serum showed a great diversity with no selection for a given allele, feature which can be indicative of incomplete adaptation (Ansorge *et al.* 1999; van Luenen *et al.* 2005). Regarding ESAG6 there was no association with any specific serum and at amino acid level, all ACLs expressed virtually the same allele, reflecting the low variability of this gene described elsewhere (Young *et al.* 2008). No consistent relation between ESAG genotypes and expressed VSG was observed in the ACLs, suggesting that expressed ESAG alleles associations with specific sera were the result of recombination events rather than *in situ* switch. BESs plasticity, mainly under adaptation conditions, has been observed in *T. b. brucei*. Thus, ESAG7 expression can be regulated in several ways such as deleting the copy from the active BES and increasing expression from inactive sites, by *in situ* switch, replacing the ESAG7 by a copy from another BES or a combination of them (van Luenen *et al.* 2005).

Other experiments performed in this thesis also suggested the less suitability of goat serum to support *T. b. gambiense* growth. Firstly, ACLs exposed to pig and human sera showed a significant decrease in duplication time after adaptation process, which it was not observed in ACLs maintained in goat serum. Expression levels of ESAGs 6 and 7 mRNA were up to 20 folds increased in goat ACLs with regard to control grown in bovine serum and however, this did not entail a higher transferrin uptake. In contrast, ACLs from human and pig sera showed 60% more transferrin uptake than calf and goat ACLs. These data suggest that *T. b. gambiense* ELIANE strain adapted well to human and pig sera, whereas its adaptation in goat serum would result in an altered and unregulated transcription of several simultaneous BESs, with no improvement in growth or transferrin uptake. The better suitability of pig serum at the parasite adaptation supports previous findings that points to this animal as main candidate to act as reservoir of *T. b. gambiense* (Mehlitz 1986; Penchenier *et al.* 1997; Simo *et al.* 2006).

Conclusions

Our data show that *T. b. gambiense* can be maintained in domestic fauna, both *in vivo* and *in vitro*, which would allow the parasite to remain epidemiologically “hidden” to control measures focused on the human reservoir. Despite the fact that pig appears to be the main candidate to act as reservoir, the parasite growth in all mammalian sera tested indicates that other species should not be dismissed. Therefore, despite the efforts undertaken by local authorities to control the disease, any attempt to eradicate HAT in endemic foci could be compromised by the existence of non-human reservoirs.

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. Taxonomía

El género *Trypanosoma* está representado por un gran número de especies de parásitos unicelulares hemoflagelados. En general, la mayor parte de ellas son transmitidas gracias a la intervención de un invertebrado hematófago que actúa como vector. Excepcionalmente, algunas especies han prescindido evolutivamente de vector, como es el caso de *Trypanosoma evansi* (Wang 1988; Woo 1977). El invertebrado (sanguijuelas, pulgas, moscas mordedoras...) no se limita a ser un mero vehículo para el parásito, sino que supone un paso crucial en su complejo ciclo vital. En el caso de los tripanosomas africanos de importancia sanitaria y veterinaria, el vector principal es la mosca tsetse (Orden: Diptera, Familia: Glossinidae), aunque algunas especies de tabánidos (Género *Tabanus*, Género *Ancala*, Género *Atylotus*) y otras especies de moscas (Orden: Diptera, Familia: Muscidae, Género: *Stomoxys*) tienen importancia en la transmisión de ciertas especies, como *T. evansi* y *Trypanosoma congolense* (Desquesnes & Dia 2003b; Sumba *et al.* 1998).

El enclave del género *Trypanosoma* en la taxonomía actual se resume en la **tabla 1**:

Categoría taxonómica	Nombre	Autor
Reino	Protozoa	<i>Goldfuss 1818</i>
Subreino	Corticata	<i>Cavalier-Smith 2002</i>
Infrarreino	Excavata	<i>Cavalier-Smith 2002</i>
Superfilo	Discicristata	<i>Cavalier-Smith 2003</i>
Filo	Euglenozoa	<i>Cavalier-Smith 1981</i>
Clase	Kinetoplastea	<i>Honigberg 1963</i>
Orden	Trypanosomatida	<i>Kent 1880</i>
Suborden	Trypanosomatina	<i>Vickerman 1976</i>
Familia	Trypanosomatidae	<i>Doflein 1901</i>
Género	Trypanosoma	<i>Gruby 1843</i>

Tabla 1. Situación taxonómica del género *Trypanosoma* sp.

A comienzos del siglo XX, los parásitos de este género se fueron distinguiendo como causantes de diversas enfermedades tropicales y clasificando en función de su patogenicidad, distribución, morfología y rango de hospedadores (Gibson 2007). No obstante, no fue hasta 1972 cuando se fijó la clasificación taxonomica más extendida para este grupo, basada en la morfología del parásito y las diferencias en su ciclo vital dentro la mosca tsetse (Hoare 1972). Después de esta revisión, la clasificación de los tripanosomas africanos quedó establecida como se muestra en la **tabla 2**:

Taxón	Nombre	Autor
Género	<i>Trypanosoma</i>	Gruby 1843
Subgénero	<i>Trypanozoon</i>	Lühe 1906
Especie	<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Plimmer and Bradford 1899
	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Dutton 1902
	<i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	Stephens and Fantham 1910
	<i>Trypanosoma evansi</i>	Balbani 1888
	<i>Trypanosoma equiperdum</i>	Doflein 1901
Subgénero	<i>Nannomonas</i>	Hoare 1964
Especie	<i>Trypanosoma congolense</i>	Broden 1904
	<i>Trypanosoma simiae</i>	Bruce 1912
Subgénero	<i>Duttonella</i>	Chalmer 1918
Especie	<i>Trypanosoma vivax</i>	Ziemann 1905

Tabla 2. Taxonomía de los tripanosomas africanos.

Con la aplicación de marcadores moleculares a los estudios taxonómicos fue necesaria una nueva reorganización de esta clasificación. Entre las técnicas empleadas en dichos estudios cabe destacar el análisis de electroforesis de isoenzimas, el estudio de los *polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción* (RFLP), la *amplificación aleatoria de ADN polimórfico* (RAPD), la *reacción en cadena de la polimerasa -- RFLP* (PCR-RFLP), *polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado* (AFLP) y, más recientemente, el análisis de mini- y microsatélites (Biteau *et al.* 2000; Gibson *et al.* 1980; Hide *et al.* 1990; MacLeod *et al.* 1999; Paindavoine *et al.* 1986). Estos trabajos han desvelado una extraordinaria heterogeneidad en el subgénero *Trypanozoon* con subagrupaciones filogenéticas que dependen principalmente del origen geográfico

más que de las subespecies esperadas. Se observó que los tripanosomas infectivos en humanos, causantes de la enfermedad del sueño, *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, son relativamente distintos a nivel genético. A grandes rasgos, *Trypanosoma brucei brucei* parece diferenciarse casi exclusivamente de *T. b. rhodesiense* en la expresión de un único gen, el *gen asociado a la resistencia al suero* (SRA), que confiere por sí solo resistencia al suero humano y al de otros primates, como el gorila (*Gorilla gorilla*) (De Greef C. *et al.* 1992).

T. b. brucei fue posteriormente subdividido en tres grupos asociados a la distribución geográfica (Kiboko, Sindo y Brucei) y al polimorfismo de los maxicírculos del ADN del kinetoplasto (Gibson *et al.* 1985; Gibson 2007; Stevens & Godfrey 1992). Por el contrario, la mayoría de los aislados de *T. b. gambiense* aparecieron asociados como un grupo muy homogéneo y claramente diferenciado del resto de los *T. brucei* s.l., por lo que se sugirió que se le restituyera su anterior estatus de especie. Asimismo, fue descrito un pequeño grupo de aislados procedentes de Costa de Marfil, de importancia marginal, que aparecen separados de este *clado* y que fue bautizado como *T. b. gambiense* grupo 2, por sus diferencias fenotípicas: mayor infectividad en roedores de experimentación y resistencia variable al suero humano (Capewell *et al.* 2011).

T. evansi, también apareció como un *clado* independiente, aunque más cercano a cepas occidentales de *T. brucei*, y se caracteriza por la pérdida total del ADN de los maxicírculos del kinetoplasto. *T. evansi* se mostró muy semejante a *Trypanosoma equiperdum*, en términos de polimorfismo de isoenzimas y ADN nuclear, aunque algunos aislados de éste último conservaran una parte de los maxicírculos del kinetoplasto (Frasch *et al.* 1980; Gibson 2007; Lun *et al.* 1992). En un estudio reciente se ha llegado a plantear que *T. evansi* y *T. equiperdum* podrían ser una única especie (Claes *et al.* 2005).

El subgénero *Nannomonas* demostró ser más diverso que *Trypanozoon*. Se definió una especie nueva, *Trypanosoma godfreyi*, y se subdividieron las otras dos en grupos; *T. congolense* en Savannah, Riverine Forest y Kilifi –o Kenya Coast- y *Trypanosoma simiae* en Simiae y Tsavo (Gibson *et al.* 2001; Lehane *et al.* 2000). Por su parte, en el subgénero *Duttonella* se eliminó la especie *Trypanosoma uniforme*, dejando como única representante del grupo a *Trypanosoma vivax*, en la que se observan dos variedades geográficas bien diferenciadas (América-África Occidental y África Oriental) tanto a nivel genético como epidemio-patológico (Cortez *et al.* 2006; Gibson 2007).

2. Estructura y ciclo vital

El género *Trypanosoma* sp. tiene una se caracteriza por una morfología alargada, con un único flagelo que se extiende en la dirección del movimiento y que se mantiene en contacto con el resto del cuerpo celular en gran parte de su longitud por una membrana. El núcleo es grande y ovalado. El tamaño de las células es variable, unos 18-42 μm de largo y 1-3 μm de ancho (ver

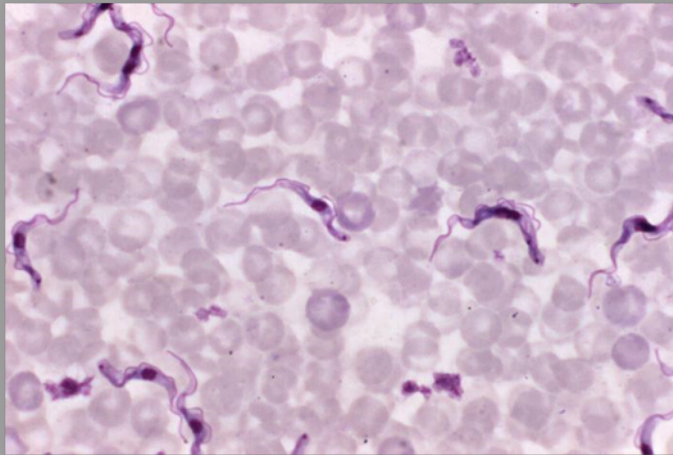


figura 1).

Figura 1

Trypanosoma brucei teñido con GIEMSA en microscopio de campo claro.

Fuente: Public Health Image Library

<http://phil.cdc.gov/>

Cuenta con todos los orgánulos celulares básicos propios de los eucariotas: aparato de Golgi, ribosomas, mitocondria, núcleo y retículo endoplásmico. No obstante, a nivel estructural *Trypanosoma* sp. presenta una serie de particularidades (ver **figura 2 y 3**):

1. Existe una única mitocondria con una gran cantidad de ADN condensado, muy ramificada y de gran tamaño, asociada al cuerpo basal del flagelo, que se conoce como kinetoplasto o cinetoplasto.
2. El citoesqueleto de la célula está formado principalmente por una malla de microtúbulos subpeliculares interconectados, en contraposición al citoesqueleto de la célula eucariota habitual en el que se combinan éstos con filamentos de actina e intermedios. Este flexible citoesqueleto permite a los tripanosomátidos desarrollar una amplia variedad de formas durante su ciclo vital (Gull 1999).
3. La superficie del parásito está recubierta por una densa capa de proteínas organizadas en dímeros llamadas *glicoproteína variable de superficie* (VSG). Su función es proteger al parásito de la respuesta inmune del hospedador, ya que es altamente inmunogénica y puede ser reemplazada cuando aparecen anticuerpos frente a ella (Pays 2005). Esta proteína se encuentra sólo presente en la forma

sanguínea del ciclo y en el tripomastigote metacíclico infectivo de la mosca tsetse (aunque con un repertorio mucho menos diverso). Cuando la forma rechoncha (*stumpy*) se diferencia a tripomastigote procíclico, la VSG es reemplazada por una capa igualmente densa de prociclina que permite al parásito sobrevivir al nuevo entorno hostil. Esta envoltura provoca además un efecto “escudo” que impide el tránsito normal de nutrientes en la célula por lo que toda la maquinaria endoexocítica queda relegada a una zona llamada bolsillo flagelar, una invaginación desde la que parte el flagelo (Field & Carrington 2004).

4. La organización del axonema flagelar sigue el canon 9+2, aunque tiene la particularidad de que existe un entramado proteico, el bastón paraflagelar, que se sitúa paralelamente al axonema, y que sólo se encuentra en tripanosomátidos, euglenoides y dinoflagelados (Ralston & Hill 2008). El flagelo parte del cuerpo basal, sale del bolsillo flagelar y permanece unido al resto del cuerpo celular por la membrana ondulante en toda o gran parte de su longitud.
5. Los estadios sanguíneos del parásito tienen un metabolismo basado en la glucosa (mediante la glicólisis) aunque, contrariamente a lo que ocurre en la mayoría de los eucariotas, las enzimas necesarias para este proceso no se encuentran en el citoplasma celular sino que se hallan concentradas en un orgánulo característico de los tripanosomátidos: el **glicosoma** (Opperdoes & Borst 1977), que probablemente evolucionó a partir de peroxisomas (Parsons 2004).

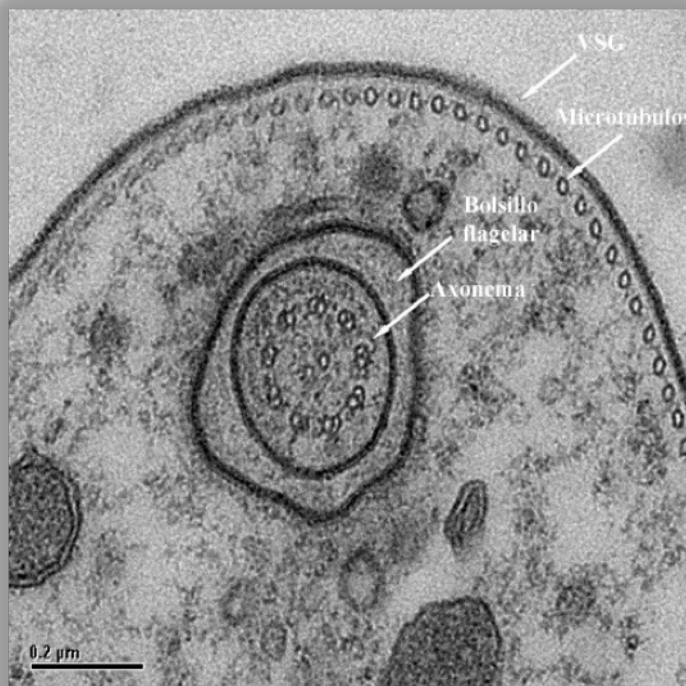


Figura 2

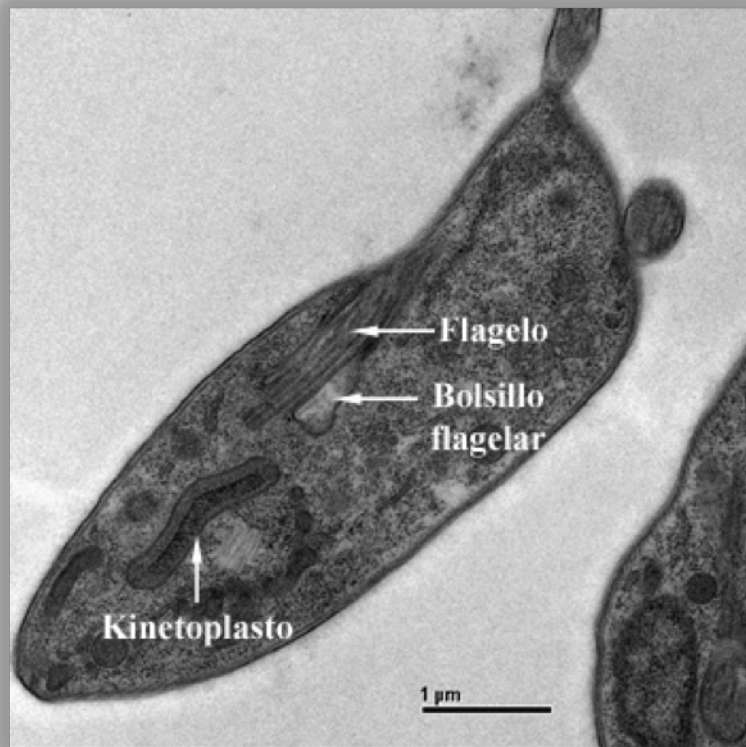
Corte transversal de *T. brucei* en microscopía electrónica de transmisión. Las flechas blancas señalan la capa de VSG, el corsé de microtúbulos, el bolsillo flagelar y la estructura flagelar 9+2 (9 parejas de microtúbulos formando un círculo y otra pareja en el centro).

Fuente: Carlos Cordón Obras

Figura 3

Corte longitudinal de *T. brucei* en microscopía electrónica de transmisión. Las flechas blancas señalan el bolsillo flagelar, el flagelo y la masa electrodensa formada por los maxicírculos del ADN mitocondrial (kinetoplasto).

Fuente: Carlos Cordón Obras



2.1 Morfología y fisiología de los subgéneros de *Trypanosoma* sp.

El **subgénero *Trypanozoon* Lühe, 1906** (grupo Brucei) se caracteriza por presentar un kinetoplasto pequeño y subterminal, y por desarrollarse en las glándulas salivares y en el intestino medio del vector. En su ciclo vital están presentes las formas tripomastigote (cuerpo basal del que parte el flagelo es posterior respecto al núcleo) y epimastigote (cuerpo basal anterior respecto al núcleo). Las formas tripomastigote, además, se caracterizan por el pleomorfismo, es decir, la diferenciación poblacional en diferentes morfotipos. Existen formas *slender* (o alargadas) proliferativas y *stumpy* (o rechonchas) no proliferativas. Las formas alargadas son las que presentan un metabolismo basado en la glucosa y realizan la glicólisis. Se dividen mediante fisión binaria en la sangre del hospedador hasta que algunos de los individuos se diferencian a *stumpy*, que presenta la mitocondria ensanchada y adaptada a un metabolismo proteico. Las formas rechonchas no se dividen en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado, ya que están adaptadas para la supervivencia en el aparato digestivo del vector invertebrado (mosca tsetsé) (Roditi & Lehane 2008).

Cuando la mosca se alimenta de un vertebrado infectado sólo los parásitos en forma *stumpy* sobreviven y se diferencian a tripomastigote procíclico en el intestino, que prolifera por fisión binaria y migra, remontando el aparato digestivo, hasta las glándulas

salivares. Allí las formas procíclicas vuelven a diferenciarse a epimastigotes proliferativos y éstos a tripomastigotes metacíclicos no proliferativos que vuelven a ser infectivos para el hospedador vertebrado. Cuando la mosca tsetse se alimenta de otro hospedador, la inoculación de saliva que acompaña a la picadura permite la introducción de estas formas infectivas, que en el torrente del vertebrado se diferencian a formas sanguíneas, cerrando así el ciclo (ver **figura 4**). A diferencia de *T. brucei* s.l., en *T. evansi* y *T. equiperdum* no se ha encontrado forma procíclica ni epimastigote, lo que se explica por la falta del ADN de su kinetoplasto (Borst *et al.* 1987; Brun *et al.* 1998; Frascch *et al.* 1980). Estas especies carecen, por tanto, de estadios vectoriales, lo que pone de manifiesto la desvinculación de su vector originario (Wang 1988; Woo 1977).

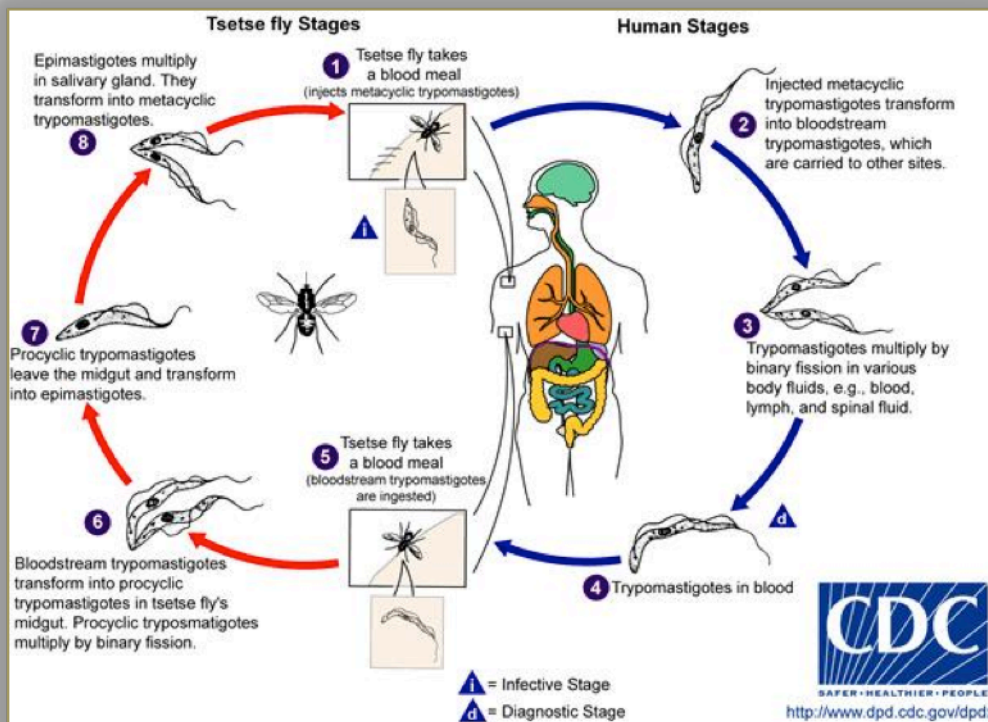


Figura 4

Ciclo vital de *T. b. gambiense*

Fuente: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

El **subgénero *Nannomonas*** Hoare, 1964 (grupo Congolense) presenta un kinetoplasto mediano y marginal, un flagelo corto no libre unido a la membrana ondulante y se desarrolla en el intestino medio y la probóscide del vector. En general, es considerada

una especie monomórfica, puesto que las formas *stumpy* son mucho menos patentes que en *Trypanozoon*. El ciclo vital es prácticamente idéntico que el del subgénero anterior, aunque existe una diferencia fundamental: los tripomastigotes procíclicos no viajan del intestino de la mosca a las glándulas salivares sino que lo hacen directamente a la probóscide del vector y allí continúan su desarrollo a epimastigote proliferativo y después a tripomastigote metacíclico infectivo (Helm *et al.* 2009).

El **subgénero *Duttonella*** Chalmer, 1918 (grupo Vivax) se caracteriza por su kinetoplasto grande y terminal, su borde posterior redondeado, su flagelo libre y su membrana ondulante más desarrollada que en *Nannomonas* pero menos que en *Trypanozoon*. Se desarrolla exclusivamente en la probóscide del vector. Aunque se considera monomórfico, existe un cierto grado de pleomorfismo y funcionalmente hay parásitos *stumpy* y *slender*. El ciclo vital se corresponde con el de *Trypanozoon*, con la excepción de que todo el desarrollo en el vector se produce en el mismo lugar – la probóscide - sin necesidad de que haya migración (Osorio *et al.* 2008).

3. Hospedadores

La familia Trypanosomatidae está compuesta por varios géneros que parasitan toda clase de vertebrados, algunos invertebrados, preferentemente insectos del orden Diptera y Hemiptera, y plantas. Los invertebrados pueden ser los únicos hospedadores, como ocurre en algunos géneros monogenéticos (*Crithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* o *Blastocrithidia*), o servir de vectores, como en los géneros digenéticos *Trypanosoma*, *Leishmania* (ambos parásitos de vertebrados) y *Phytomonas*, que infecta plantas empleando como vectores algunas especies de coleópteros (Maslov *et al.* 2001).

En el caso de los tripanosomas africanos de relevancia sanitaria y veterinaria, el invertebrado vector es la mosca tsetse (Orden Diptera; Familia Glossinidae; Género *Glossina*), cuya área de distribución se limita al África subtropical y tropical (franja comprendida entre los paralelos 15° N y 20° S, aproximadamente), y sur de la península arábiga (*Glossina tachinoides*). Ambos sexos son hematófagos y, en consecuencia, machos y hembras pueden contraer y transmitir la infección. La mosca tsetse se infecta, normalmente, en las primeras ingestas de sangre y pueden transmitir el tripanosoma durante toda su vida (un promedio de 2-3 meses). Su ciclo vital es bastante inusual, puesto que es larvípara y sólo engendra una larva por puesta (ver **figura 5**). La hembra sólo se reproduce una vez en la vida, almacena el esperma del macho en una espermateca y periódicamente se insemina con él (un máximo de 10-12 veces en toda su vida). Se estima que la población, en condiciones óptimas, no se multiplica más de 10 o 15 veces al año (Hargrove 1988).

Así pues, teniendo en cuenta su baja tasa de reproducción y otros factores como una reducida variabilidad genética intrapoblacional, su dificultad para contraer y transmitir la infección y su gran sensibilidad a los insecticidas modernos (fundamentalmente de la familia de los piretroides), no podríamos considerar a la glossina tan eficaz como otros dípteros vectores (Kuzoe & Schofield 2004). Existen 23 especies de mosca tsetse, presentando cada una de ellas un área de distribución determinada; aspectos como preferencias alimenticias, selección de hábitat y receptividad para las diferentes especies de *Trypanosoma* sp varían de una especie de glossina a otra.

Las especies de mosca tsetse están agrupadas en tres subgéneros: subgénero *Austenina* (grupo **fusca**), subgénero *Nemorhina* (grupo **palpalis**) y subgénero *Glossina* (grupo

morsitans). En general, las especies incluidas en los dos primeros grupos muestran preferencia por ecosistemas selváticos y los bosques de ribera de África Occidental y Central, mientras que las especies del grupo **morsitans** habitan las secas sabanas de la zona oriental del continente.

La capacidad vectorial de las glossinas viene determinada por muchos factores. Entre otros, la especie (tanto del vector como del tripanosoma), el sexo de la mosca (en general la tasa de infección es más alta en las hembras, aunque puede haber un sesgo en relación con la mayor longevidad de éstas), la edad de la glossina (se infectan más fácilmente las moscas jóvenes, sobre todo para especies de tripanosoma que desarrollan parte de su ciclo en el intestino, como *T. brucei* o *T. congolense*), la temperatura ambiental y los hospedadores disponibles (Aksoy *et al.* 2003).

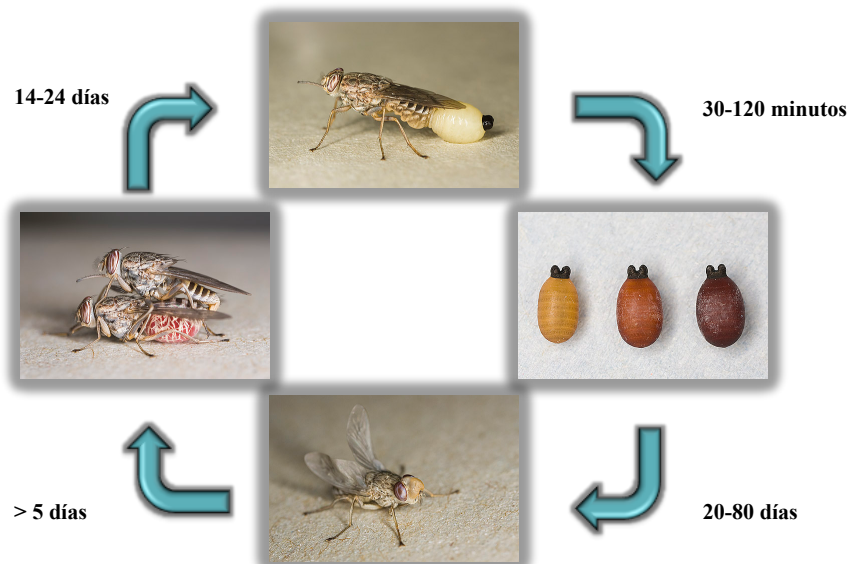


Figura 5

Ciclo vital de la mosca tsetse.

Fuente: Carlos Cordón Obras a partir de fotos de <http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/>

Las preferencias alimentarias del vector son el primer sesgo que tiene el parásito para seleccionar su espectro de hospedadores. Las especies de glossina presentan diferentes patrones de alimentación que pueden variar localmente en función de la disponibilidad de presas. No obstante, se han llegado a identificar hospedadores prioritarios para varias especies. Por ejemplo, *Glossina morsitans* tiene predilección por los suidos salvajes (como el facoquero –*Phacochoerus* sp-), *Glossina pallidipes* por los rumiantes y *Glossina brevipalpis* por hipopótamos (*Hippopotamus amphibius*), mientras que el grupo **palpalis** parece tener un carácter marcadamente oportunista, alimentándose de una amplia variedad de especies de mamíferos, reptiles y aves (Clausen *et al.* 1998;

Sane *et al.* 2000; Spath 2000). De manera generalizada, se asume que las moscas del grupo **morsitans** son fundamentalmente zoófilas mientras que las que pertenecen al grupo **palpalis** son antropófilas, lo que tiene una gran relevancia en la epidemiología de la enfermedad del sueño.

Desde el punto de vista del parásito podemos afirmar que, en general, todos los tripanosomas africanos son tolerantes a una amplia variedad de hospedadores. Dentro del subgénero *Trypanozoon*, *T. b. brucei* parasita a un gran número de vertebrados: ungulados domésticos y salvajes (bóvidos, suidos, équidos, jirafas...), hipopótamos, algunos primates, carnívoros (cánidos, félicos, mustélidos...), etc. (Isobe *et al.* 2003). No obstante, no es capaz de sobrevivir en el suero humano debido a la presencia del *factor tripanolítico* (TLF). Se trata de una proteína de la fracción de las lipoproteínas de alta densidad presentes en el suero, la *apolipoproteína L1* (ApoL1), que evolucionó en los grandes simios africanos para protegerlos frente a la infección por la mayoría de los tripanosomas (Pays & Vanhollebeke 2008). En sus hospedadores, *T. b. brucei* puede causar una enfermedad crónica y degenerativa conocida como *nagana*, de diversa gravedad dependiendo de la especie parasitada pero que, en general, se caracteriza por el desarrollo de anemia (severa, a medida que progresa la infección), prurito, conducta errática, fiebre, edema y pérdida de condición. El parásito puede encontrarse tanto en circulación sanguínea como en líquidos intersticiales y tejidos.

Dos subespecies de *T. brucei* se adaptaron para resistir la acción del TLF del suero humano: *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense*, causando la THA o enfermedad del sueño. El primero es capaz de infectar a un amplio espectro de hospedadores vertebrados (Ng'ayo *et al.* 2005; Njiru *et al.* 2004; Waiswa *et al.* 2003), además del ser humano. De hecho, la infección por *T. b. rhodesiense* se considera una zoonosis (el reservorio natural es la fauna local), registrándose anualmente pocos casos de infección en humanos (Smith *et al.* 1998; Welburn *et al.* 2006). La infección por *T. b. gambiense* se considera una antroponosis, siendo el hombre el principal reservorio (Barrett *et al.* 2003; Smith *et al.* 1998). Aunque se sabe que otros vertebrados pueden ser parasitados por *T. b. gambiense* (Herder *et al.* 2002; Njiokou *et al.* 2006; Simo *et al.* 2006), su importancia epidemiológica no está inequívocamente definida. A diferencia de *T. b. brucei*, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense* son parásitos casi exclusivamente hemáticos, aunque también acaban invadiendo linfa y líquido cefalorraquídeo (LCR).

T. evansi infecta a una gran diversidad de mamíferos como cérvidos, camélidos, bóvidos, équidos, algunos carnívoros y proboscídeos, habitando principalmente en el

torrente sanguíneo. En África puede ser transmitido de forma mecánica por la mosca tsetsé y otros dípteros (Brun *et al.* 1998; Sumba *et al.* 1998), como comentamos anteriormente, puesto que no desarrolla ninguna fase de su ciclo vital fuera del hospedador vertebrado. La enfermedad que causa se conoce como *surra* y se caracteriza por un cuadro de fiebre y anemia, seguida de edema, caquexia, esplenomegalia y linfadenitis. Puede haber afectación neurológica después de varios años de curso crónico. La gravedad de la enfermedad es variable en función de la cepa del parásito, la especie hospedadora y otros factores externos (Brun *et al.* 1998). En los últimos años se ha diagnosticado un caso de tripanosomiasis humana por este parásito en la India (Joshi *et al.* 2005), aunque más tarde se asoció esta infección con una deficiencia de ApoL1 (Vanhollebeke *et al.* 2006).

T. equiperdum ha prescindido de vectores y la transmisión se produce exclusivamente por vía venérea entre equinos. Causa la enfermedad conocida como *durina*, con una sintomatología semejante a la *surra*, pero mucho más localizada inicialmente en el aparato urogenital (placas urticantes, inflamación y edema), dado su carácter fundamentalmente tisular. Incluso en condiciones de laboratorio, es extremadamente difícil (aunque posible) conseguir que se infecten los animales de experimentación. Este hecho es indicativo de que su reducido rango de hospedadores no es sólo debido a su modo de transmisión (Brun *et al.* 1998).

T. congolense ha sido descrito como uno de los parásitos de mayor importancia veterinaria ya que puede infectar a una amplia variedad de especies de ganado doméstico africano, así como a una extensa variedad de ungulados silvestres (Gibson 2007). Al igual que *T. b. brucei* causa *nagana* en sus hospedadores, aunque la enfermedad suele ser más grave, llegando a la letalidad en muchos casos. Las pérdidas económicas y de productividad ganadera como consecuencia de la infección por *T. congolense* constituye un freno para el desarrollo de muchos países del África Subsahariana (Kristjanson *et al.* 1999). Se han descrito casos aislados de infección en humanos, aunque no se han podido explicar claramente y podrían estar asociados a una inmunosupresión subyacente (Joshua 1989; Truc *et al.* 1998).

T. simiae parasita principalmente suidos salvajes y causa una enfermedad aguda y rápidamente letal en cerdos domésticos (Gibson 2007; Hoare 1972).

T. vivax, aunque emplea a la mosca tsetsé como principal vector en África, ha sido capaz de expandir su área de distribución fuera del continente africano gracias a su facilidad para ser transmitido de forma mecánica por otros dípteros (Delafosse *et al.*

2006; Desquesnes & Dia 2004; Gardiner 1989; Hoare 1972). Aunque se ha demostrado que otros tripanosomas como *T. congolense* o *T. b. brucei* pueden ser transmitidos mecánicamente, el hecho de que no se encuentren fuera del área de distribución de la mosca tsetse indica claramente la poca importancia epidemiológica de este tipo de transmisión para estas especies (Desquesnes & Dia 2003a; Mihok *et al.* 1995). A diferencia de *T. evansi*, *T. vivax* sí tiene estadios vectoriales proliferativos, así que su adaptación a la transmisión mecánica es consecuencia de su resistencia fuera del hospedador vertebrado. Se cree que *T. vivax* llegó a América procedente de ganado infectado de las colonias de África Occidental a mediados del siglo XVIII. Esta hipótesis se ve reforzada por estudios filogenéticos que demuestran la clara similitud entre las cepas americanas y las de África del Oeste, mientras que señalan diferencias significativas con respecto a los aislados de la zona oriental del continente (Cortez *et al.* 2006).

T. vivax en África afecta principalmente a ungulados domésticos, como bóvidos, équidos y camélidos, en los que causa la *nagana*, y antílopes salvajes, que actúan como reservorios sin sufrir la enfermedad. En Suramérica, además de los bovinos y bubalinos, ungulados salvajes y roedores (capibaras) pueden ser parasitados por esta especie. A diferencia de lo que ocurre en el continente africano, no se ha observado la enfermedad en équidos americanos (Osorio *et al.* 2008).

4. Tripanosomiasis humana africana

4.1 Etiología y Clínica

La THA está causada por dos subespecies de *T. brucei* s.l., los dos únicos tripanosomas africanos capaces de sobrevivir y proliferar en presencia de suero humano: *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*. Son morfológicamente indistinguibles entre sí y de *T. b. brucei*, aunque su separada distribución geográfica facilita el diagnóstico en la práctica. En términos generales, la enfermedad cursa con un cuadro clínico similar, aunque la cronicidad y la severidad del proceso varían considerablemente en la infección por una u otra subespecie. *T. b. gambiense* provoca una enfermedad crónica que puede extenderse durante varios años aunque algunos autores la limitan a dos o tres, mientras que *T. b. rhodesiense* es causante de una patología aguda que puede desarrollarse en meses o incluso semanas (ver **tabla 3**).

Fase	Signo/Síntoma	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
Período de incubación	Chancro doloroso	Infrecuente	Frecuente
Fase linfático-sanguínea	Adenopatía cervical (Winterbottom)	Frecuente	Infrecuente
	Fiebre	Frecuente	Frecuente
	Edema palpebral y facial	Infrecuente	Frecuente
	Tripánides (<i>rush</i> cutáneo)	Frecuente	Infrecuente
	Síntomas tóxicos: : vómitos, cefaleas, mialgias y prurito (intenso, frecuente y poco significativo)	Frecuente	Frecuente
	Afectación cardíaca (arritmias, miocarditis, pericarditis)	Ocasional	Frecuente
Fase meningo-encefálica	Fase temprana: : Irritabilidad, inestabilidad, pérdida de concentración, alteración personalidad, somnolencia, hiperestesia cutánea profunda (Signo de Kerandel)	Frecuente	Ocasional
	Afectación neurológica severa: mental, motora y endocrina	Frecuente	Ocasional
	Alteración Ciclo Sueño (alteración fase REM)	Frecuente	Ocasional

Tabla 3. Sintomatología de la THA causada por *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*. La mayor severidad se expresa en **negrita**.

En general, el curso de la enfermedad puede dissociarse en dos estadios. La **fase linfático-sanguínea**, caracterizada por cursar con una sintomatología difusa e inespecífica, y la **fase meningo-encefálica**, que se produce al pasar el parásito al *sistema nervioso central* (SNC) atravesando la barrera hemato-encefálica y provocando síntomas neurológicos.

En ausencia de tratamiento, se asume que la enfermedad es letal en el 100% de los casos. Aunque existen evidencias de portadores asintomáticos o curaciones espontáneas en la primera fase, no se ha demostrado de manera concluyente y, en todo caso, deben tratarse como casos marginales (Checchi *et al.* 2008; Koffi *et al.* 2006).

4.2 Diagnóstico y tratamiento

La primera fase de la enfermedad no cursa con síntomas patognomónicos, aunque en la práctica la aparición del signo de *Winterbottom* (linfadenitis cervical) en zonas endémicas de *T. b. gambiense* suele orientar la sospecha diagnóstica de tripanosomiasis. La visualización directa del parásito es la única manera de obtener un diagnóstico completamente certero por lo que, pese a la laboriosidad y la baja sensibilidad, se sigue empleando.

Existen varias alternativas para detectar al parásito directamente en sangre. La más sencilla consiste en examinar directamente frotis sanguíneos, aspiraciones de nódulos linfáticos inflamados o LCR. Estos procedimientos son poco sensibles, por lo que habitualmente se utilizan técnicas de concentración de la muestra para incrementar las posibilidades de éxito. Entre ellas, destaca la *centrifugación en tubo capilar* (mHCT), el *buffy coat cuantitativo* (QBC) y la *filtración en columna de intercambio aniónico* (mAECT).

Otros métodos de detección directos se basan en la identificación de antígenos o fragmentos de ADN específicos del parásito. Esta aproximación permite distinguir entre infecciones pasadas y presentes, lo que es extremadamente útil para hacer seguimiento post-tratamiento de los pacientes. Los antígenos comúnmente empleados como diana para el diagnóstico son proteínas de superficie como VSG, dado su gran abundancia e inmunogenicidad. Se han obtenido resultados aceptables mediante pruebas de *ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima* (ELISA) (Nantulya 1989; Nantulya *et al.* 1992) y el *test de aglutinación indirecta en tarjeta para tripanosomiasis* (CIATT), un sistema para la detección de antígenos de *T. brucei* mediante aglutinación en tarjeta fácil de usar y rápido. Esta técnica parecía ofrecer una alta sensibilidad y especificidad (Nantulya 1997), aunque en posteriores estudios se han observado valores de especificidad menores al 95-100% descritos en las pruebas iniciales (Asonganyi *et al.* 1998).

Las técnicas de diagnóstico molecular dirigidas a la amplificación de fragmentos específicos de ADN han supuesto un gran avance en los estudios epidemiológicos, aunque tienen importantes limitaciones para el diagnóstico de campo. Existen varias

modalidades, aunque las más empleadas son la PCR (Mullis 1990) y la *amplificación mediada por bucle en condiciones isotermas* (LAMP) (Notomi *et al.* 2000), ambas basadas en la amplificación y posterior visualización de secuencias de ADN específicas del agente. Existen numerosos marcadores moleculares para *T. brucei* s.l. (Cox *et al.* 2005; Desquesnes *et al.* 2001; Kabiri *et al.* 1999; Kuboki *et al.* 2003; Li *et al.* 2007; Moser *et al.* 1989; Njiru *et al.* 2008), no así para *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*. El diagnóstico molecular específico de *T. b. gambiense* se realiza, de manera generalizada, basándose en la detección del gen de copia única *glicoproteína específica de Trypanosoma gambiense* (TgsGP) (Berberof *et al.* 2001; Radwanska *et al.* 2002b), mientras que la detección molecular de *T. b. rhodesiense* se ha centrado en el gen SRA (Picozzi *et al.* 2008; Radwanska *et al.* 2002a; Welburn *et al.* 2001).

A pesar de la gran sensibilidad y especificidad de este tipo de herramientas, en la actualidad su empleo está limitado a la investigación puesto que requiere personal entrenado y complejo equipamiento, factores que hacen a estas técnicas difíciles de exportar al terreno para su empleo masivo en encuestas de detección activa (Deborggraeve & Buscher 2010).

En la actualidad, la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de *T. b. gambiense* es el *test de aglutinación en tarjeta para la tripanosomiasis* (CATT) (Magnus *et al.* 1978). Consiste en la exposición de un fluido corporal del hospedador (sangre, suero, saliva o líquido cefalorraquídeo) con un antígeno del parásito y la visualización directa de la aglutinación resultante con los anticuerpos específicos circulantes. La prueba es rápida (unos 5 minutos), se pueden efectuar hasta 10 diagnósticos simultáneos y se ve el resultado a simple vista. Se emplea de manera generalizada en estudios de campo (detección activa de casos) para llevar a cabo el cribado de sero-sospechosos, mostrando, en general, una buena sensibilidad y especificidad y un alto valor predictivo negativo (Chappuis *et al.* 2002; Chappuis *et al.* 2004; Garcia *et al.* 2000; Magnus *et al.* 2002; Pansaerts *et al.* 1998; Robays *et al.* 2004; Simarro *et al.* 1999; Truc *et al.* 2002; Zoller *et al.* 2008). No obstante, se han observado problemas relativos a la especificidad (Asonganyi *et al.* 1998) y a la sensibilidad, relacionados con la región geográfica (Dukes *et al.* 1992).

El diagnóstico de la enfermedad, incluyendo la correcta identificación del parásito a nivel subespecífico, no es suficiente para la elección de un tratamiento. El fármaco empleado y su posología dependen del estadio de la enfermedad y de la subespecie causante. Por otra parte, puesto que el tratamiento de la fase tardía resulta complejo y

son frecuentes los efectos secundarios, en algunos casos severos, la determinación del estadio de la infección debe hacerse de manera precisa. Este se lleva a cabo a partir del análisis del LCR del paciente, considerándose la invasión del SNC si cumple al menos uno de los siguientes criterios (Chappuis *et al.* 2005): observación de células blancas o leucocitos (>5 células/ μ l), alta concentración de proteínas totales (>370 mg/l) o presencia del parásito.

La alta concentración de proteínas en LCR es un criterio actualmente en desuso debido a su baja especificidad. Existen varias infecciones en el medio tropical que pueden causar una elevada proteinorraquia. La visualización directa del parásito es, al igual que en el caso del diagnóstico en sangre, el único método plenamente fiable. No obstante, adolece de la misma falta de sensibilidad, lo que hace necesarios los otros criterios expuestos anteriormente. Técnicas de concentración como la doble centrifugación o la mAECT, pueden compensar, en parte, estas limitaciones. En cualquier caso, la extracción de LCR debe realizarse mediante punción lumbar, lo que requiere personal médico especializado y un ambiente lo más estéril posible.

Actualmente sólo existen cinco fármacos para el tratamiento de la THA. Dos de ellos, la *suramina* (1916) y la *pentamidina* (1937) no atraviesan la barrera hemato-encefálica y por tanto sólo son efectivos si la enfermedad se encuentra en el primer estadio.

El primer tratamiento para la fase meningo-encefálica no llegó hasta mediados del siglo XX con la aparición del *melarsoprol* (1949), un derivado arsenical. Su toxicidad es muy elevada, provocando una mortalidad atribuible al tratamiento de 3-7% por síndrome encefalopático además de otra serie de complicaciones (Schmid *et al.* 2005). No obstante, ante la falta de alternativas, continúa siendo el único fármaco para la segunda fase de la infección por *T. b. rhodesiense*. La *eflornitina* (DFMO)(1990) es el tratamiento actualmente más extendido para la fase meningo-encefálica de la infección por *T. b. gambiense* (Steverding 2008). Este fármaco resulta ineficaz para el tratamiento de la THA por *T. b. rhodesiense*, ya que esta subespecie tiene intrínsecamente una tasa de renovación de ornitina descarboxilasa, la enzima inhibida por el DFMO, mayor que *T. b. gambiense* (Burri & Brun 2003). El tratamiento con DFMO puede ser combinado con *nifurtimox*, fármaco empleado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, para reducir su duración (Yun *et al.* 2010).

El hecho de que todos los fármacos disponibles en la actualidad, con la excepción de la *eflornitina*, fueran desarrollados hace más de 60 años, es una muestra clara del escaso interés que despierta esta enfermedad en la industria farmacéutica.

4.3 Epidemiología y control

La THA es endémica del continente africano. Se distribuye en aproximadamente 250 focos de 36 países del África sub-sahariana, abarcando un área superior a los 1.5 millones de km² donde habría más de 70 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (Cattand *et al.* 2001; Simarro *et al.* 2012; WHO 1998). *T. b. gambiense* está presente en África Occidental y Central, y *T. b. rhodesiense* en África del Este. Hasta la fecha, sólo se ha observado la coexistencia de estas dos subespecies en ciertos focos del noroeste de Uganda y sur de Sudan (Picozzi *et al.* 2005).

La mayor parte de los casos registrados son debidos a *T. b. gambiense*, siendo solo unos pocos centenares los casos producidos por *T. b. rhodesiense* en la zona oriental del continente, más allá de los grandes lagos (Simarro *et al.* 2010; Simarro *et al.* 2011) (ver **figura 6**).

La mosca tsetse es el único vector conocido para *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*. La transmisión mecánica, si existe, es epidemiológicamente irrelevante puesto que no hay casos de THA autóctona fuera de los límites de distribución de la mosca. Las especies de glossina del grupo **palpalis** (*Nemorhina*) son vectores más eficaces para *T. b. gambiense* y el grupo **morsitans** (*Glossina*) lo es para *T. b. rhodesiense*. Estas diferencias en la eficiencia específica del vector explica las áreas de distribución tan marcadas que presentan las dos formas de la enfermedad (Kuzoe & Schofield 2004).

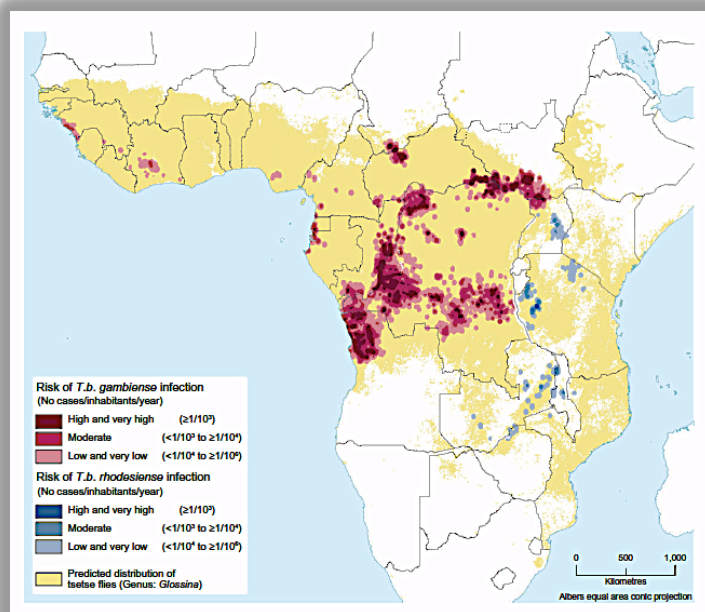


Figura 6

Mapa de distribución de la THA en África.

Fuente:

Simarro *et al* 2013

En los últimos años la situación epidemiológica ha mejorado ostensiblemente gracias al fortalecimiento de los programas nacionales de control de la THA de países endémicos, que han intensificado las acciones de vigilancia y control con el apoyo técnico y financiero de la comunidad internacional e instituciones especializadas. En este sentido, al enfocarse fundamentalmente la vigilancia sobre el reservorio humano, el impacto sobre la enfermedad ha sido más drástico en la forma gambiense, permaneciendo la incidencia de *T. b. rhodesiense* relativamente constante a lo largo de los años (Simarro *et al.* 2008). En 2006 se informaron 11.868 casos de THA (11.382 por *T. b. gambiense* y 486 por *T. b. rhodesiense*), mientras que en 2011 esta cifra disminuyó de forma global hasta los 6.743 (Simarro *et al.* 2012). La mayoría de los países afectados tienen una incidencia residual (sólo 6 de los 36 países declararon más de 100 casos en 2009), aunque la THA constituye un problema sanitario importante en Angola, Sudán, República Centroafricana, el Chad y República Democrática del Congo (Simarro *et al.* 2008; Simarro *et al.* 2010).

Por primera vez en 50 años, se ha logrado reducir la incidencia de casos por debajo de los 10.000 (WHO 2010). Sin embargo, teniendo en cuenta la debilidad de los sistemas sanitarios de muchos de los países endémicos, y lo remoto y aislado de muchos de los focos, cabe esperar una subestimación de la incidencia así como de la mortalidad debida a la THA (Simarro *et al.* 2012). En el caso de la tripanosomiasis por la forma *rhodesiense*, en los últimos años se ha estimado que en Uganda, uno de los países con mayor incidencia, existe una subestimación de casos de entre un 38% y un 41% (Odiit *et al.* 2005). Con respecto a la tripanosomiasis *gambiense* se ha demostrado que a medida que disminuye la prevalencia de la enfermedad, factores tales como la limitada sensibilidad de las pruebas diagnósticas (especialmente las pruebas parasitológicas o confirmatorias) y en mayor medida la tasa de participación comunitaria en las encuestas de detección activa, condicionan el infradiagnóstico de casos (Robays *et al.* 2004).

Como hemos comentado anteriormente, la enfermedad del sueño afecta, principalmente, a la población de zonas rurales remotas donde los sistemas de salud son menos eficientes, o inexistentes. La población que vive en estos medios y dependen de la agricultura, pesca, ganadería o caza es la más expuesta a la picadura de la mosca tsetse. El riesgo de que aparezcan nuevos focos o se reactiven focos controlados, aumenta en situaciones políticas inestables, desplazamientos de población por causa de conflictos armados y situación de pobreza extrema (Barrett *et al.* 2003; Fevre *et al.* 2006).

Aunque la disminución drástica de la incidencia de casos de THA es un hecho en muchos focos, en raras ocasiones se ha descrito la total eliminación. Incluso en ausencia de casos durante años, la desaparición de las acciones de control y vigilancia ha traído consigo en el pasado la aparición de brotes epidémicos con altas tasas de mortalidad por *T. b. gambiense* (Courtin *et al.* 2008; Louis *et al.* 2002). Los posibles motivos de estos rebrotes serán tratados más adelante en el presente trabajo de investigación al analizar la situación de los focos endémicos de Guinea Ecuatorial.

El control de la THA comenzó a mediados del siglo XX como respuesta a las grandes epidemias que asolaron el continente africano. La primera de ellas, entre 1896 y 1906, afectó fundamentalmente a Uganda y al Congo, provocando casi un millón de muertos (De Raadt 1999; Hide 1999). Las administraciones coloniales, preocupadas por los devastadores efectos de la enfermedad, promovieron “movilizaciones científicas” con la finalidad de encontrar una manera de controlarla.

De estos esfuerzos surge en 1926 un concepto de control que se perpetúa hasta la actualidad y que sigue siendo la manera más efectiva de controlar la transmisión de la THA por *T. b. gambiense*: la detección activa de casos mediante equipos móviles. El Dr. Eugène Jamot (1879-1937), médico militar francés, puso en marcha en Camerún un sistema de búsqueda activa de casos y tratamiento empleando equipos móviles, con el objetivo de reducir la incidencia del parásito en el reservorio humano y así interrumpir la transmisión. Esta estrategia demostró ser altamente efectiva y ayudó a contrarrestar la segunda epidemia de THA del continente africano (entre 1920 y finales de los años 40), por lo que hoy se continúa empleando con algunas variaciones metodológicas relativas al diagnóstico y al tratamiento (Cattand *et al.* 2001; Courtin *et al.* 2008; Louis *et al.* 2008; Lutumba *et al.* 2005; Steverding 2008; WHO 1998). No obstante, la búsqueda activa de casos es totalmente ineficaz para *T. b. rhodesiense* puesto que el principal reservorio es animal y los métodos de diagnósticos actuales no son adecuados para el monitoreo masivo.

Otros mecanismos de lucha contra la THA nacieron en la misma época, como el control vectorial y el control de reservorios animales. La primera experiencia exitosa en el ámbito del control vectorial tuvo lugar en la isla de Príncipe (Santo Tomé y Príncipe), donde se consiguió la erradicación de *G. palpalis* en 1914 mediante el uso de rudimentarias trampas (telas negras impregnadas de lima) portadas por trabajadores de campo (Kuzoe & Schofield 2004). A partir de ese momento, el empleo de trampas se fue extendiendo y evolucionando con la adición de cebos odorantes, insecticidas e

incluso artefactos eléctricos, como ventiladores, para impedir la salida de las moscas. Otros conceptos como la destrucción selectiva de hábitat, el rociamiento masivo con insecticidas (pulverizaciones aéreas secuenciales con bajas concentraciones de insecticidas piretroides) y, más recientemente, el empleo de machos estériles irradiados, han resultado exitosos en el control del vector. Lamentablemente, el problema de la reinvasión por poblaciones de *glossina* de zonas limítrofes no sometidas al mismo tratamiento siempre fue, y continúa siendo, la principal limitación para lograr una total eliminación del vector en focos endémicos, que solo se ha conseguido en ocasiones muy puntuales y en condiciones particulares de aislamiento (Kuzoe & Schofield 2004; Vreysen *et al.* 2000).

El control sobre reservorios animales fue una práctica habitual entre 1920 y 1940, principalmente para frenar la enfermedad por *T. b. rhodesiense*. Puesto que ya era conocida su condición de zoonosis, se practicó la caza masiva de hospedadores salvajes, consiguiéndose con ello la reducción, aunque nunca la total eliminación de los casos (De Raadt 1999; Steverding 2008). El empleo de medicación para la prevención y tratamiento de la tripanosomiasis en animales domésticos, es otro método de control disponible en la actualidad (Awa & Ndamkou 2006). Sin embargo, el desarrollo de resistencias a este tipo de drogas constituye una importante limitación para su implantación a gran escala (Geerts *et al.* 2001).

4.4 Aspectos moleculares de la epidemiología de la THA

4.4.1 *Estudios poblacionales y patogenicidad de T. b. gambiense*

El desarrollo de la biología molecular en los últimos años ha permitido mejorar el conocimiento que existe sobre la epidemiología de la enfermedad del sueño. Por un lado, los marcadores genéticos empleados para estudios poblacionales (mini- y microsatélites, *polimorfismo de nucleótido único* –SNP-, AFLP, patrones isoenzimáticos...) han contribuido a ampliar nuestro conocimiento sobre el origen y la distribución de los tripanosomas africanos.

Gracias a estas técnicas también ha podido confirmarse la presencia de infecciones mixtas en la mosca tsetse (MacLeod *et al.* 1999) y el intercambio genético que se produce en las glándulas salivares cuando el parásito se encuentra en la fase proliferativa de epimastigote (Gibson *et al.* 2006; Gibson *et al.* 2008; Hide 2008). Estas

observaciones no parecen ser válidas para *T. b. gambiense* (MacLeod *et al.* 2001), aunque es probable que la aparente ausencia de intercambio de material genético sea una consecuencia de la rareza de las infecciones mixtas más que a la propia incapacidad del parásito. En general, se asume que *T. b. gambiense* se separó de la especie original *T. b. brucei* antes que *T. b. rhodesiense*, lo que explicaría las diferencias existentes en el mecanismo desarrollado por estas subespecies para sobrevivir a los TLFs del suero humano (MacLeod *et al.* 2001). A nivel poblacional, *T. b. brucei*, la subespecie originaria, parece tener una estructura epidémica -intercambio genético al azar enmascarado por algunos genotipos predominantes-, mientras que *T. b. rhodesiense* y *T. b. gambiense* despliegan una estructura clonal -ausencia de intercambio genético perceptible- (Koffi *et al.* 2009; MacLeod *et al.* 2000; Morrison *et al.* 2008).

Por otra parte, los marcadores genéticos han permitido situar taxonómicamente una población de *T. b. gambiense* aislada en Costa de Marfil. Inicialmente fue considerada como un extraño fenotipo de esta subespecie debido a su distribución geográfica y por causar varias infecciones en humanos de una virulencia inusitada, más propia de la tripanosomiasis aguda causada por *T. b. rhodesiense*. Estos aislados fueron clasificados como *T. b. gambiense* grupo 2, mientras el anteriormente conocido como *T. b. gambiense* pasaba a ser *T. b. gambiense* grupo 1. Sorprendentemente, *T. b. gambiense* grupo 2 demostró ser genéticamente mucho más afín a *T. b. brucei* y *T. b. rhodesiense* que al homogéneo grupo formado por *T. b. gambiense* grupo 1. Sin embargo, no expresa el gen SRA, marcador inequívoco de *T. b. rhodesiense*, ni tampoco el TgsGP, uno de los pocos genes específicos conocidos para *T. b. gambiense* grupo 1 (Berberof *et al.* 2001; Radwanska *et al.* 2002b).

4.4.2 Adaptación en reservorios animales

T. b. brucei es un parásito zoonótico capaz de infectar a una gran diversidad de hospedadores. Esta característica es compartida por *T. b. rhodesiense*, cuya infección en humanos se considera epidemiológicamente anecdótica. *T. b. gambiense*, por el contrario, parece haber alcanzado un alto grado de especialización a su principal hospedador, el humano, aunque ha sido observado también en otros muchos animales. (Gibson *et al.* 1978; Mehlitz 1986; Simo *et al.* 2006). Existe una gran controversia en lo que respecta al mecanismo molecular que permite la adaptación de *T. b. brucei* a diferentes especies animales. Una de las hipótesis más aceptadas es que los

genes localizados en sitios de expresión podrían jugar un papel importante en esta adaptación (Gerrits *et al.* 2002; Pays *et al.* 2001). La VSG, la proteína mayoritaria del parásito, cubre la práctica totalidad de la superficie celular y cambia periódicamente para sobrevivir a la respuesta inmunitaria del hospedador. Esta proteína se caracteriza por ser transcrita únicamente en los telómeros de varios cromosomas, en una unidad de transcripción policistrónica que se conoce como *sitio de expresión de la forma sanguínea* (BES). Los BESs tienen una serie de características peculiares. En primer lugar su transcripción se lleva a cabo por la ARN polimerasa I (varias veces más activa que la ARN polimerasa II) y comienza en un promotor situado unas 40-50 kb antes de la propia VSG. Entre este promotor y la VSG existen una serie de *genes asociados al sitio de expresión* (ESAGs) que se co-transcriben con la VSG (Berriman *et al.* 2002) (ver **figura 7**). En un momento dado solamente puede estar activo un sitio de expresión, mecanismo conocido como expresión mono-alélica (Borst *et al.* 1996; Cross *et al.* 1998).

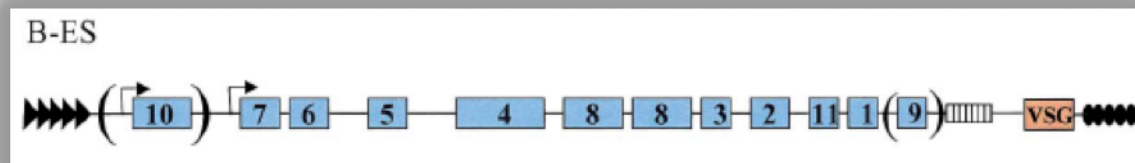


Figura 7

Esquema de la estructura de sitio de expresión (BES).

Fuente: Pays y col., 2001 (Pays *et al.* 2001)

En general, la función de los ESAGs es bastante desconocida (McCulloch & Horn 2009; Pays *et al.* 2001). Una de las excepciones a esta norma es el gen SRA de *T. b. rhodesiense*, que permite al parásito sobrevivir en presencia de suero humano. Su condición de ESAG provoca que la sero-resistencia de *T. b. rhodesiense* sea una característica variable y condicionada a la activación de un sitio de expresión concreto (Xong *et al.* 1998).

Los ESAG 6 y 7 han sido también bien caracterizados; codifican el receptor de **transferrina** (molécula transportadora de hierro en su hospedador) de *T. brucei*. Al igual que el gen SRA, presentan homología con la VSG, lo que es un indicativo de un

posible origen común. El receptor de transferrina se expresa como un heterodímero en el bolsillo flagelar del parásito y presenta dos zonas de unión a la transferrina con un importante grado de polimorfismo entre los diferentes sitios de expresión (Steverding 2000). Considerando que la transferrina es esencial para el crecimiento del parásito (Schell *et al.* 1991), se ha sugerido que este polimorfismo puede ser utilizado por el parásito para adaptarse a su hospedador, puesto que la transferrina varía hasta un 30% en su secuencia de aminoácidos entre algunas especies de mamíferos (Gerrits *et al.* 2002).

La gran mayoría de los estudios realizados hasta la fecha sobre los ESAGs y la adaptación a diferentes sueros han utilizado como modelo *T. b. brucei*, debido a que no es patogénico en humanos, crece fácilmente *in vitro* y su genoma completo fue publicado en 2005 (Berriman *et al.* 2005). No obstante, el trabajo con los sitios de expresión tiene la dificultad añadida de que únicamente se encuentran en los telómeros, zonas que son difícilmente representadas en las estrategias utilizadas para la secuenciación masiva. Este problema supuso una traba para la obtención de secuencias teloméricas fiables hasta que se desarrolló una técnica conocida como la *recombinación asociada a la transformación* (TAR), que consiste en crear cromosomas artificiales de levadura fusionados con secuencias teloméricas (Larionov *et al.* 1994). Fue aplicado a *T. b. brucei*, lográndose así publicar gran cantidad de secuencias de ESAGs (Becker *et al.* 2004).

Pese a que el genoma de *T. b. gambiense* fue publicado recientemente (Jackson *et al.* 2010), no ha aportado gran información en lo que a los sitios de expresión se refiere y aunque la TAR ha sido aplicada para esta subespecie, solo ha sido publicada información parcial sobre los ESAGs 6, 5 y 2 (Young *et al.* 2008). Así pues, el estudio de los mecanismos de adaptación de *T. b. gambiense* a los diferentes hospedadores, de gran relevancia desde un punto de vista epidemiológico, plantea importantes retos debido a la falta de información que existe sobre las zonas del genoma que pudieran estar directamente implicadas en dichos procesos.

5. Tripanosomiasis humana en Guinea Ecuatorial

Históricamente existen cuatro focos endémicos de THA en Guinea Ecuatorial (Simarro *et al.* 1988), tres focos continentales y uno insular (ver **figura 8**). Globalmente, un 24.1% del territorio del país se considera área de riesgo para la enfermedad del sueño, lo que supone un espacio habitado por unas 43.000 personas (6.8% de la población total) (Simarro *et al.* 2012). Los tres focos continentales están situados en la costa: Kogo, al sur compartiendo frontera con Gabón, Campo, al norte, fronterizo con Camerún, y Mbini, próximo a la capital de la región continental.

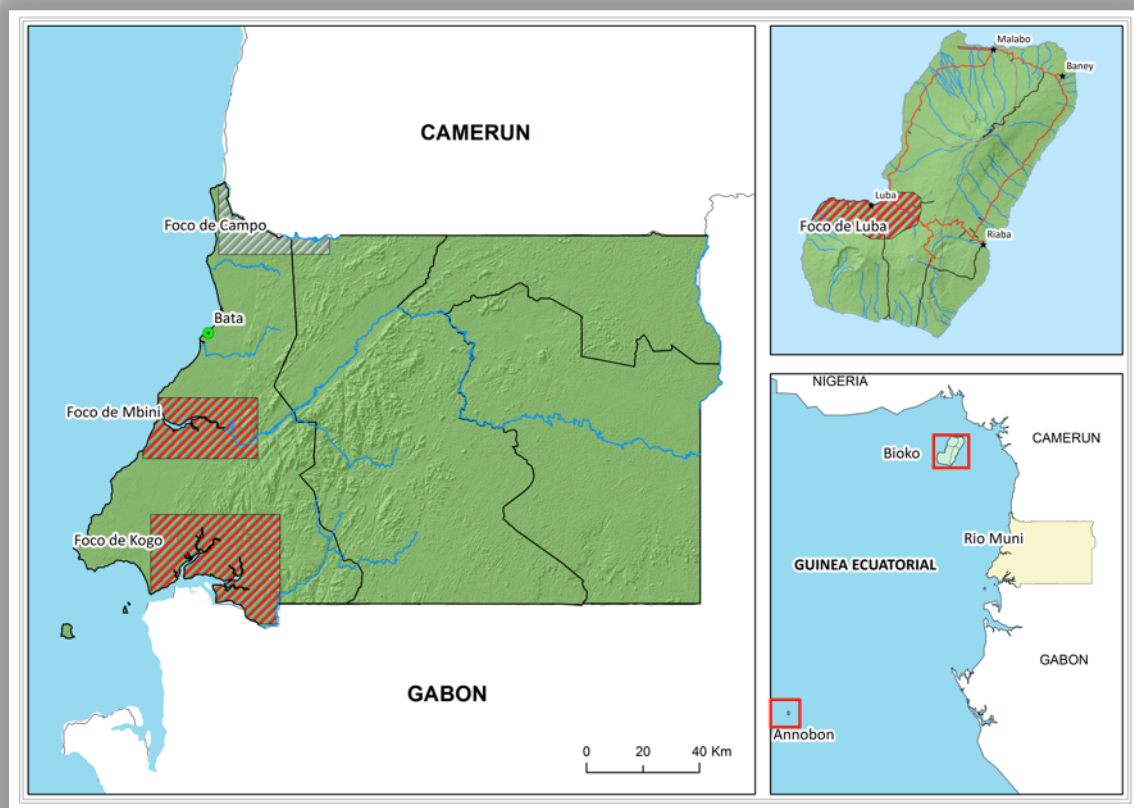


Figura 8

Localización geográfica de los focos endémicos de THA en Guinea Ecuatorial

Fuente: Jorge Cano Ortega.

Kogo y Mbini pertenecen a la provincia costera de Litoral y comparten ciertas características ecológicas que proporcionan las condiciones adecuadas para la proliferación de diversas especies de mosca tsetse. La población de los dos distritos se distribuye en torno a un cauce fluvial principal, el río Wele en el caso de Mbini y el estuario del Muni, formado por la confluencia de los ríos Congüe, Mitong y Mitemele, en el caso de Kogo. La desembocadura de estos cauces así como la red de afluentes secundarios, están colonizadas por los mangles (*Rhizophora mangle* y *Avicennia nitida*), generando el ecosistema típico de manglar ribereño, hábitat idóneo para *Glossina palpalis palpalis*, principal vector de la THA en África Central (Cano *et al.* 2007a; Cano *et al.* 2007b).

Luba se encuentra al sur de la isla de Bioko, donde abundan el bosque húmedo tropical o pluvisilva, las aéreas de bosque secundario, resultado del abandono de las plantaciones de cacao y café que fueron explotadas en la primera mitad del siglo pasado y, en menor medida, pequeñas explotaciones agrícolas donde se cultiva cacao, plátano y palmera de aceite. Estas zonas son hábitats igualmente idóneos para *G. p. palpalis*, como demostró un estudio llevado a cabo en la zona (Simarro *et al.* 1990). En los últimos años, el desarrollo de la industria petrolífera ha hecho que las zonas rurales de la isla se hayan despoblado progresivamente al trasladarse los habitantes a la ciudad de Luba o a la cercana capital, Malabo.

La población autóctona rural de Guinea Ecuatorial sigue viviendo fundamentalmente de la explotación agrícola, la caza y la pesca artesanal. En la zona de litoral de la región continental es habitual encontrar asentamientos de población en los márgenes de los cauces fluviales conocidos localmente como *pesquerías* o *pescaderías*. La presencia humana en estos asentamientos suele ser temporal, y está ligada a los periodos de mareas favorables para la pesca fluvial. La actividad pesquera es mucho más importante en Kogo que en Mbini, hasta el punto que algunas de las pesquerías han llegado a convertirse en asentamientos permanentes. En Luba, esta actividad se da principalmente en el mar.

Los focos continentales de THA siempre han tenido una importancia marginal en comparación con el foco de Luba, históricamente el más activo. Hace varias décadas, Luba registraba centenares de casos al año, por lo que se pusieron en marcha una serie de estrategias orientadas a reducir la carga de enfermedad y a controlar la transmisión de la THA en el distrito, fundamentadas en la detección temprana de los casos y,

garantizando su correcto manejo clínico y tratamiento a nivel del hospital distrital (Simarro *et al.* 1991; Simarro *et al.* 2006).

Kogo y Mbini fueron sometidos a campañas similares, aunque no resultaron tan efectivas como en Luba por diversos factores. La situación insular proporciona a la isla de Bioko un grado de aislamiento que dificulta la reintroducción de nuevos casos (o moscas infectadas) desde zonas limítrofes, condición que ya ha permitido la eliminación de la mosca tsetse y la erradicación de la enfermedad en otras islas como Zanzíbar y Príncipe (Da Costa 1916; De Raadt 1999; Vreysen *et al.* 2000). Otros factores, como los mencionados cambios económicos (principalmente la explotación de combustibles fósiles) y el consecuente abandono de las actividades rurales como la ganadería y la agricultura, han podido contribuir al extraordinario éxito del programa de control en Luba.

En el período comprendido entre 2003 y 2009, en los focos de Kogo y Mbini, se complementaron estas estrategias con la lucha antivectorial mediante el empleo intensivo de trampas monopiramidales en zonas con riesgo de contacto con las poblaciones vectoras (*G. p. palpalis*). El control vectorial con este tipo de trampa ha sido previamente empleado con éxito en otros focos africanos (Abel *et al.* 2004; Gouteux & Lancien 1986; Simarro *et al.* 1990). Esta campaña anti-vectorial tuvo éxito en el control de las poblaciones de mosca tsetse y, probablemente, acarrió un impacto indirecto sobre el control de la enfermedad, aunque este último aspecto no ha podido ser cuantificado (Cano *et al.* 2007a; Cano *et al.* 2007b).

A pesar de todas estas medidas, en los últimos años, las encuestas de detección activa han revelado un goteo continuo de casos en los focos continentales; entre 7 y 32 casos anuales entre 2000 y 2009 (la mayoría en Mbini), sin conseguirse una completa eliminación como la observada en el foco de Luba (Simarro *et al.* 2006). Especulando sobre los motivos que impiden la eliminación de la enfermedad en estos focos, una posibilidad sería la existencia de individuos asintomáticos que sirvieran de reservorios de la infección (Koffi *et al.* 2006), un grupo mucho más difícil de controlar en poblaciones con mayor movilidad, como las de los focos continentales, que en núcleos más localizados y sedentarios, como es el caso del foco insular de Luba.

La reintroducción de casos desde poblaciones limítrofes no sujetas a control epidemiológico y/o vectorial también podría explicar las diferencias entre focos continentales e insular (Courtin *et al.* 2008). Por otra parte, al basar el control de la transmisión en la búsqueda activa de casos se cometen sesgos inherentes a las propias

Tripanosomiasis humana y reservorios animales

técnicas (sensibilidad limitada) y/o a la dependencia respecto del grado de participación de la población en dichas encuestas. A medida que la prevalencia de la infección por *T. b. gambiense* disminuye, la sensibilidad de las pruebas diagnósticas, así como el porcentaje de población bajo control, influyen más significativamente en la eficacia de esta estrategia (Louis *et al.* 2008).

Especie	Nombre común	Orden	Hábitat	Referencias
<i>Cercocebus torquatus</i>	Mangabeye rojo	Primates	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Cercopithecus nictitans</i>	Cercopiteco de nariz blanca	Primates	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Cephalophus dorsalis</i>	Cefalofo bayo	Artiodáctilos	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Cephalophus monticola</i>	Cefalofo azul	Artiodáctilos	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Kobus kob thomasi</i>	Cobo de Uganda	Artiodáctilos	Salvaje	(Guedegbe <i>et al.</i> 1992)
<i>Sus scrofa</i>	Cerdo	Artiodáctilos	Doméstico	(Gibson <i>et al.</i> 1978; Jamonneau <i>et al.</i> 2004; Njiokou <i>et al.</i> 2010; Simo <i>et al.</i> 2006)
<i>Capra hircus</i>	Cabra	Artiodáctilos	Doméstico	(Njiokou <i>et al.</i> 2010)
<i>Ovis aries</i>	Oveja	Artiodáctilos	Doméstico	(Njiokou <i>et al.</i> 2010)
<i>Atherurus africanus</i>	Puercoespín africano	Roedores	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Crycetomix gambianus</i>	Rata gigante africana	Roedores	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Genetta servalina</i>	Jineta servalina	Carnívoros	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Nandinia binotata</i>	Civeta de la palma africana	Carnívoros	Salvaje	(Njiokou <i>et al.</i> 2006)
<i>Panthera leo</i>	León	Carnívoros	Salvaje	(Guedegbe <i>et al.</i> 1992)
<i>Canis familiaris</i>	Perro	Carnívoros	Doméstico	(Gibson <i>et al.</i> 1978)

Tabla 4. Especies animales en las que *T. b. gambiense* ha sido detectado.

Otra teoría, compartida por varios autores, es la existencia de reservorios animales, domésticos y salvajes, que podrían estar manteniendo la infección en focos hipodémicos e incluso en ausencia de casos humanos (Guedegbe *et al.* 1992; Herder *et al.*

2002; Makumyaviri *et al.* 1989; Njiokou *et al.* 2005; Njiokou *et al.* 2006; Simo *et al.* 2006). *T. b. gambiense* ha sido detectado con anterioridad en animales en varios países de África Central y Occidental, tales como Camerún (Njiokou *et al.* 2006), Costa de Marfil (Jamonneau *et al.* 2004), República Democrática del Congo (Makumyaviri *et al.* 1989), Benin (Guedegbe *et al.* 1992), Liberia (Gibson *et al.* 1978) y Burkina Faso (Mehlitz *et al.* 1982). Entre las especies portadoras se encuentran mamíferos de varios órdenes tanto de fauna doméstica como salvaje (ver **tabla 4**).

Nunca se ha llevado a cabo un estudio concluyente en Guinea Ecuatorial para determinar si la fauna local puede estar actuando como reservorio de la infección y, por tanto, ser ésta la causa principal del fracaso en la eliminación de los focos continentales pese a los grandes esfuerzos realizados para controlar esta enfermedad.

Los pocos casos documentados de la presencia de *T. b. gambiense* en la fauna local son sin duda un reflejo de los pocos estudios realizados. Una buena prueba de esta afirmación es que *T. b. gambiense* ha sido encontrado en animales prácticamente en todos los focos en los que ha sido buscado. Estos estudios se centran habitualmente en las especies de caza y en reservorios domésticos, puesto que en ambos casos resulta relativamente sencillo obtener muestras para el análisis molecular, pero esto supone un sesgo en el análisis, ya que no se tiene información de otras muchas especies que potencialmente podrían intervenir en el mantenimiento del ciclo del parásito.

Por lo tanto, es bastante probable que *T. b. gambiense*, al igual que *T. b. brucei*, pueda sobrevivir y proliferar en un amplio espectro de hospedadores y su menor prevalencia en éstos sea debido a la dificultad que demuestran los vectores para adquirir y transmitir la infección más que a la incapacidad del parásito de colonizar a otros reservorios (Kuzoe & Schofield 2004).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

1. Objetivos generales

Determinar la importancia epidemiológica de los reservorios animales en el mantenimiento de la transmisión de la tripanosomiasis humana africana en África Central y analizar los mecanismos moleculares que median en la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores.

2. Objetivos específicos

1. Establecer la frecuencia de infección por *T. brucei* s.l. y otros tripanosomas animales (*T. congolense* Forest, *T. congolense* Savannah y *T. vivax*) en la fauna peri-doméstica de los focos continentales de Guinea Ecuatorial (Kogo y Mbini).
2. Analizar el posible papel de la fauna doméstica local como reservorios de la infección por *T. b. gambiense* en los focos endémicos de Guinea Ecuatorial.
3. Confirmar la eliminación de *T. b. gambiense* en el foco insular de Luba, analizando el riesgo de una posible reintroducción o rebrote del foco.
4. Realizar una aproximación a los posibles ciclos epidemiológicos de *T. b. gambiense* existentes en los diferentes focos históricos de Guinea Ecuatorial y recomendar estrategias de control acordes con la situación particular de cada uno.
5. Estudiar los mecanismos moleculares que median en la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores mediante modelos de análisis *in vitro*.

3. Hipótesis

1. ***Establecer la frecuencia de infección por T. brucei s.l. y otros tripanosomas animales (T. congolense Forest, T. congolense Savannah y T. vivax) en la fauna peri-doméstica de los focos continentales de Guinea Ecuatorial (Kogo y Mbini).***
 - 1.1. *T. congolense* Forest es el parásito predominante en la fauna local mientras que el resto de tripanosomas animales tienen una escasa prevalencia, siguiendo un patrón similar al observado en países vecinos.

- 1.2. Como se ha observado en otros países de la subregión, la frecuencia de infección por *Trypanosoma* sp. es más alta en cerdos que en otras especies animales que forman parte del ganado doméstico.

- 2. *Analizar el posible papel de la fauna doméstica local como reservorios de la infección por T. b. gambiense en los focos endémicos de Guinea Ecuatorial.***
 - 2.1. *T. b. gambiense* está presente en una baja prevalencia en la fauna doméstica local de Kogo y Mbini, principalmente en cerdos, tal y como se ha observado en focos del vecino Camerún.
 - 2.2. Teniendo en cuenta las diferencias ecológicas y la variabilidad en los hábitos de vida de las poblaciones humanas asentadas en Kogo y Mbini, esperamos observar diferencias significativas en la frecuencia de infección por *T. b. gambiense* en hospedadores animales entre estos dos focos.

- 3. *Confirmar la eliminación de T. b. gambiense en el foco insular de Luba, analizando el riesgo de una posible reintroducción o rebrote del foco***
 - 3.1. *T. b. gambiense* ha sido eliminado completamente del ciclo epidemiológico en Luba, puesto que desde el año 1995 no se han diagnosticado nuevos casos de la enfermedad en humanos.
 - 3.2. El vector de la tripanosomiasis en el foco de Luba, *G. p. palpalis*, está presente en la zona y es especialmente abundante en localidades del epicentro del foco.

- 4. *Realizar una aproximación a los posibles ciclos epidemiológicos de T. b. gambiense existentes en los diferentes focos históricos de Guinea Ecuatorial y recomendar estrategias de control acordes con la situación particular de cada uno.***
 - 4.1. La fauna local contribuye al mantenimiento de la infección por *T. b. gambiense* en los focos continentales de Kogo y Mbini, actualmente en fase de eliminación.
 - 4.2. Las estrategias de control deben adecuarse a las particularidades epidemiológicas de cada foco.

5. Estudiar los mecanismos moleculares que median en la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores mediante modelos de análisis *in vitro*.

- 5.1. *T. b. gambiense* es capaz de adaptarse a diferentes sueros animales en los modelos *in vitro* y mantener intacta su capacidad infectiva en humanos.
- 5.2. La adaptación a los diferentes hospedadores animales está basada en los sitios de expresión del parásito, ya sea a nivel de VSG o de ESAGs.
- 5.3. Los ESAG6/7 (receptor de transferrina) han perdido la variabilidad en *T. b. gambiense* debido a la adaptación a su principal hospedador humano, y como consecuencia de ello no cabe esperar que se dé un proceso de variación antigénica (*switching*) en poblaciones cultivadas *in vitro* cuando se exponen a diferentes sueros animales.

DISCUSIÓN INTEGRADORA

1. Tripanosomas animales y humanos

La tripanosomiasis animal está ampliamente extendida por todo el mundo dada la capacidad de los parásitos de este género para adaptarse a una gran variedad de vertebrados de todas las clases (Hoare 1972). Los tripanosomas africanos de importancia veterinaria suponen una amenaza para la economía de las naciones afectadas, puesto que generan grandes pérdidas en sectores tan cruciales como la ganadería en un entorno rural de subsistencia (Connor 1994; Shaw 2009). A esto tenemos que añadir que la mayor parte de estos países se encuentran entre los menos desarrollados del mundo (Brun *et al.* 2010; Hotez *et al.* 2007; Simarro *et al.* 2011).

Los estudios llevados a cabo en Guinea Ecuatorial, objeto del presente proyecto de tesis doctoral, demuestran que este país centroafricano, al igual que los países limítrofes, presenta tasas de prevalencia elevada de los tripanosomas más relevantes a nivel veterinario. Estos estudios se han centrado en Kogo, Mbini y Luba, los focos históricos de Guinea Ecuatorial. Los dos primeros son, en la actualidad, los focos endémicos de THA más importantes del país, tanto por su dimensión geográfica como por su contribución a la incidencia global. Luba, por su parte, fue en el pasado el foco más activo, pero se encuentra en proceso de eliminación y no se han diagnosticado casos de THA desde hace más de quince años (Simarro *et al.* 1990; Simarro *et al.* 2006). En este último caso, el interés de nuestras investigaciones iba encaminado a confirmar si paralelamente a la eliminación de la enfermedad se había logrado también su erradicación, lo cual pasa por demostrar la ausencia del parásito en los diferentes eslabones de su ciclo vital.

La THA es una enfermedad controlada en Guinea Ecuatorial. Podemos afirmar que la ausencia de casos en Luba es el resultado del éxito en el control de la enfermedad en este foco y se debe en mayor medida a las intensas campañas de control llevadas a cabo en este distrito (ver apartado 5 de Introducción).

Los focos de Kogo y Mbini, donde se han llevado a cabo las mismas actividades de control, han mostrado una caída igualmente drástica en el número de pacientes diagnosticados, pero la infección por *T. b. gambiense* nunca ha terminado de eliminarse, registrándose casos anualmente (WHO 2006). En la actualidad, Mbini es el foco más

activo de Guinea Ecuatorial, habiendo registrado el 76% (48/63) de los casos de tripanosomiasis humana en todo el país entre 2005 y 2009 (datos no publicados, PNCTHA). Por el contrario, Kogo se muestra epidemiológicamente como un foco menos activo, registrándose únicamente 10 casos desde 2005, de los cuales sólo 4 fueron confirmados mediante diagnóstico parasitológico (datos no publicados, PNCTHA). Además, la mayor parte de estos casos correspondieron a población del vecino Gabón, donde las actividades de control son más irregulares o prácticamente inexistentes. El hecho de que no se haya conseguido la eliminación de la enfermedad en estos focos pese a las exhaustivas campañas de control epidemiológico, y vectorial desde 2001, hace plantearnos ciertos interrogantes sobre la epidemiología de la THA en este contexto de hipo-endemicidad.

El mantenimiento y la re-emergencia de *T. b. gambiense* en focos hipo-endémicos ha sido atribuida a diversos factores como la existencia de individuos asintomáticos infectados (Koffi *et al.* 2006), la reintroducción de casos debido a movimientos de población (Courtin *et al.* 2008) y/o a las limitaciones inherentes de los métodos de diagnóstico disponibles (Louis *et al.* 2008) (ver apartado 5 de la Introducción). Estas hipótesis no son necesariamente excluyentes, aunque resulta difícil determinar su contribución relativa a la reactivación de focos controlados. Otros autores han sugerido la existencia de reservorios alternativos que mantendrían al parásito en ciclos animales, silvestres o domésticos (Gibson *et al.* 1978; Njiokou *et al.* 2006; Njiokou *et al.* 2010), “oculto” desde un punto de vista epidemiológico, a unas campañas de control basadas en la búsqueda activa del tripanosoma en el reservorio humano. Algunos autores han trabajado sobre modelos matemáticos según los cuales se deduce que el mantenimiento de la infección por *T. b. gambiense* no hubiera sido posible en el continente africano sin la existencia de reservorios animales, dado el intenso control al que fue sometida la enfermedad durante el siglo XX (Rogers 1988). Esta hipótesis vendría avalada por la identificación recientemente de *T. b. gambiense* en varias especies de mamíferos (Massussi *et al.* 2010; Njiokou *et al.* 2006; Njiokou *et al.* 2010).

En sintonía con esta teoría, el presente proyecto de investigación ha buscado explicar el mantenimiento de la hipo-endemicidad en los focos continentales de THA de Guinea Ecuatorial desde la perspectiva de la existencia de reservorios animales en el entorno peri-doméstico.

Una primera aproximación consistió en analizar la prevalencia de *T. brucei* y otros tripanosomas en ganado, a fin de valorar el grado de transmisión sobre la fauna “no controlada” por las encuestas epidemiológicas.

Los resultados mostraron que la infección por *T. brucei* s.l. es muy frecuente entre los animales domésticos estudiados en los focos endémicos, siendo casi anecdótica la infección por otras especies como *T. vivax* o *T. congolense*. *T. brucei* s.l. fue significativamente más prevalente en el foco de Mbini que en el de Kogo. Este hecho sugeriría una mayor tasa de transmisión en el primero, acorde con el aparente mayor contacto entre mosca y ganado (Cano *et al.* 2007b). Algunos estudios llevados a cabo en el vecino Camerún, en zonas próximas a los focos continentales de Guinea Ecuatorial, refirieron asimismo elevadas tasas de infección por *T. brucei* s.l. (Simo *et al.* 2006). Sin embargo, otros autores han encontrado una mayor abundancia de *T. congolense* Forest y *T. vivax* entre las principales especies de ganado peri-doméstico, apareciendo *T. brucei* s.l. como una infección más residual (de Almeida *et al.* 1998; Solano *et al.* 1999). Estos resultados discordantes pueden deberse a diferencias en la metodología empleada para la detección específica de tripanosomas y/o a la variabilidad en el potencial transmisor de las diferentes especies vectoras, aspecto sobre el que ahondaremos en otra sección de la discusión (ver apartado 2 de la Discusión).

Contrastando con las altas tasas de infección de *T. brucei* s.l. en Mbini, *T. congolense* (Forest y Savannah) y *T. vivax* fueron diagnosticados con prevalencias inferiores al 3%. *T. congolense* Forest apareció en un 6.5% de los animales del foco de Kogo y *T. vivax* se identificó en únicamente dos animales (0.5%). Estas cifras suponen una prevalencia muy inferior a la observada para estas especies de tripanosoma en otros focos de la subregión. No se registraron casos de *T. congolense* Savannah en el foco en Kogo.

En Luba únicamente se efectuó la identificación molecular de *T. brucei* s.l., obteniendo una prevalencia menor al 10% en el ganado peri-doméstico, muy por debajo de las cifras de los focos continentales, lo que indicaría una menor intensidad de transmisión.

La presencia de *T. b. gambiense* en animales domésticos de Mbini, refuerza la hipótesis de la existencia de un ciclo de transmisión peri-doméstico en este foco. En este contexto, la fauna que habita en estrecho contacto con la población local podría estar actuando como reservorio de la infección, impidiendo la eliminación de la enfermedad a pesar de la presión ejercida sobre la infección en el hospedador humano mediante las periódicas campañas de detección activa y el tratamiento de los sero-sospechosos. Por el contrario, en Kogo no se detectaron infecciones por *T. b. gambiense* en fauna

doméstica, posiblemente por la ausencia de ésta en los secaderos de pescados donde existe una mayor concentración de las poblaciones vectoras (Cano *et al.* 2007a). En este foco la transmisión estaría fundamentalmente vinculada a la pesca y sin mediación de la fauna como reservorio, lo que habría hecho que las estrategias enfocadas hacia el control de la infección en el hospedador humano hayan resultado más efectivas. Esto explicaría la casi total ausencia de casos en los últimos años.

En el foco de Luba, tampoco se encontró *T. b. gambiense* en animales domésticos y se observó además, un número mucho menor de ganado en comparación con los focos continentales. No obstante, este parásito fue encontrado en el vector, como veremos más adelante (ver apartado 2 de la Discusión). Puesto que no se ha descrito transmisión vertical en el vector, no hay casos humanos autóctonos desde 1995 y la vida media de una mosca tsetse es de aproximadamente tres meses, parece evidente que el parásito únicamente podría permanecer en un ciclo animal. Al no ser encontrado en animales domésticos, la fauna salvaje debería ser considerada como el mejor candidato para actuar como reservorio en este foco (ver apartado 3 de la Discusión).

2. Vector

Las diferencias observadas en las cifras de prevalencia de tripanosomas animales entre los focos de Guinea Ecuatorial pueden explicarse en parte teniendo en cuenta los datos entomológicos disponibles.

Estudios previos sugieren que las poblaciones de *G. p. palpalis* no se distribuyen de la misma manera en Kogo y Mbini. En el primero, parecen concentrarse especialmente en las zonas donde hay un mayor número de pesquerías (Cano *et al.* 2007a). En Mbini, por el contrario, se detectó una mayor densidad en zonas circundantes a los principales asentamientos de población del distrito, donde se vienen diagnosticando casos de enfermedad del sueño en los últimos años (Cano *et al.* 2007b). Esto podría explicar la presencia de *T. b. gambiense* en los animales de Mbini, la mayor prevalencia de *T. b. brucei* en la fauna peri-doméstica y la continua, aunque baja, incidencia de casos humanos en este foco a pesar de las actividades de control.

En lo referente a la distribución de prevalencia de los tripanosomas animales, es bastante inusual la presencia de *T. congolense* Savannah en estos focos. *G. p. palpalis* es normalmente considerada como un vector ineficaz de *T. congolense* (Aksoy *et al.* 2003; Mooloo & Kutuza 1988; Ndegwa *et al.* 1992), aunque probablemente esta afirmación deba restringirse a *T. congolense* Savannah, dada la alta frecuencia con la que se ha descrito la variedad Forest en esta glossina (Farikou *et al.* 2010; Masiga *et al.* 1996; McNamara *et al.* 1995; Morlais *et al.* 1998b). La aparición de *T. congolense* Savannah únicamente en Mbini podría tener relación con una mayor presencia de otras especies de glossina en este foco. Mientras que la gran mayoría de capturas en Kogo correspondieron a *G. p. palpalis*, en Mbini cerca de un 30% de las capturas fueron de *Glossina tabaniformis*, especie estrechamente vinculada a la transmisión de tripanosomas animales (Cano *et al.* 2007b). No hay estudios al respecto del potencial vectorial de esta especie en la infección por *T. congolense* Savannah, aunque *G. tabaniformis* ha sido descrita como importante vector de tripanosomiasis animal en algunos focos de Gabón y República Democrática del Congo (Leak *et al.* 1991). La relativa alta densidad de esta especie en Mbini (Cano *et al.* 2007b) contrasta con su escasa presencia en Kogo (Cano *et al.* 2007a), y es un claro ejemplo de las diferencias en la distribución específica de la glossina, incluso a nivel local.

En el foco de Luba, aparentemente sólo dos de los diez poblados muestreados en el epicentro revelaron una alta densidad de mosca tsetse. Prácticamente todas las capturas correspondieron a *G. p. palpalis* y casi el 90% de las moscas recolectadas se recogieron en Bococo Drumen y Bococo Avedaño, dos poblados costeros ubicados en la zona sur del distrito de Luba. Estos poblados mostraron niveles de densidad de mosca tsetse significativamente superiores a los registrados en las demás localidades, incluyendo los datos obtenidos previamente en Kogo y Mbini (Cano *et al.* 2007a; Cano *et al.* 2007b). Factores como la condición rural, el grado de aislamiento, una mayor concentración de plantaciones de cacao y la ausencia de actividades de control vectorial, pueden haber contribuido al desarrollo de las poblaciones de glossina en estos lugares. No obstante, uno de los factores que pueden ser más determinantes para la presencia del vector, es la mayor disponibilidad de presas, tanto domésticas como salvajes, en las localidades del suroeste de Luba. Además, en dichas localidades el número de hembras de *G. p. palpalis* capturadas fue superior a la de machos, lo cual es característico en poblaciones activas no sujetas a control, mientras que esta proporción fue cercana al 50% para los otros poblados del foco. En estudios previos llevados a cabo en los focos continentales, se observó una variación estacional de la proporción de sexos, capturándose un mayor número de hembras después de un pico de densidad de *G. p. palpalis* típicamente alcanzado al final de la época lluviosa (Cano *et al.* 2007a; Cano *et al.* 2007b). El muestreo de este estudio fue efectuado durante la estación lluviosa con el objeto de recolectar tantas moscas como fuera posible y por tanto, se esperaba una alta proporción de hembras. Este patrón es más notable en los dos poblados con una mayor densidad del vector, donde se espera que los datos obtenidos sean menos susceptibles a errores estocásticos.

Este trabajo reveló la presencia de una mosca tsetse portadora de *T. b. gambiense* en el foco de Luba, demostrando la persistencia de un ciclo de transmisión en este foco. Aunque sólo un individuo fue considerado como positivo (prevalencia ~ 0.1%), este resultado concuerda con datos bibliográficos previos, en los que se describen tasas de infección extremadamente bajas en el vector incluso en zonas de alta endemicidad (Ferreira *et al.* 2008; Kuzoe & Schofield 2004). Sería muy interesante estudiar las preferencias alimentarias de la mosca tsetse en Luba para así poder discriminar potenciales candidatos para actuar como reservorios del parásito en este foco.

Una posible limitación del estudio tendría relación con la manera en que fueron procesadas las moscas tsetse capturadas. Al procesar individuos completos para el

análisis molecular y no diseccionar el tubo digestivo, una práctica más ortodoxa pero también más costosa en tiempo, no se pudo distinguir entre moscas infectadas (infección en el intestino medio) e infectivas (presencia del parásito en glándulas salivares). En cualquier caso, la existencia de un hospedador infectado portador de *T. b. gambiense* del que se alimentara la mosca tsetsé antes de ser capturada, demostraría igualmente que el parásito aún permanece en el ciclo.

La tasa de infección para *T. brucei* s.l. en moscas de Luba fue de 28.6%, con una distribución desigual entre los poblados. Bococo Avendaño presentó una prevalencia significativamente mayor (38.9%) de *T. brucei* s.l. en moscas respecto a otros poblados. En la literatura se asume de manera generalizada que el promedio de la tasa de infección por *Trypanosoma* sp. en mosca tsetsé es normalmente inferior al 10% (Aksoy *et al.* 2003; Kuzoe & Schofield 2004; Morlais *et al.* 1998a), aunque existen resultados bastante discordantes. No disponemos de datos relativos a la infección de mosca tsetsé en los focos continentales de Guinea Ecuatorial aunque un trabajo reciente llevado a cabo en el vecino Gabón, en localidades cercanas al foco de Kogo, mostró una elevada prevalencia de *T. brucei* s.l. (62,5%) en glossinas, mientras que la infección por otras especies de tripanosoma fueron menos patentes (*T. vivax* 10,6% y *T. congolense* Forest 13,5%) (Kohagne *et al.* 2010). De la misma forma, otros estudios han mostrado tasas de infección por *T. brucei* en mosca tsetsé cercanas al 50% en Camerún y Costa de Marfil (Masiga *et al.* 1996; McNamara *et al.* 1995; Morlais *et al.* 1998b).

La comparación de resultados de estos estudios conlleva siempre ciertos sesgos, puesto que se han empleado diferentes metodologías y los resultados pueden variar en función de la proporción relativa de las especies analizadas, tanto del vector como de hospedadores. Así, en varios trabajos se ha observado discordancia en los resultados obtenidos comparando metodologías clásicas (disección de aparato digestivo de la mosca) y análisis moleculares (PCR) en muestras procedentes de artrópodos (Gillingwater *et al.* 2010; Morlais *et al.* 1998a; Morlais *et al.* 1998b; Simo *et al.* 2011). Se postula que *G. p. palpalis* muestra cierta preferencia alimentaria hacia el ganado porcino en su alimentación (Laveissiere & Hervouet 1991; Sane *et al.* 2000), aunque su carácter oportunista también ha sido constatado en varios trabajos (Clausen *et al.* 1998; Simo *et al.* 2008). Un estudio extensivo con muestras de varios focos africanos mostraron la capacidad de adaptación del grupo **palpalis** a la disponibilidad de hospedadores (Clausen *et al.* 1998). Según esos estudios los ejemplares del grupo **morsitans** parecen, sin embargo, tener preferencia por los mamíferos salvajes de la

familia suidae, bóvidos y en el caso de *G. morsitans*, hipopótamos, mientras que aves, reptiles y primates son raramente elegidos como hospedadores. En cambio, las moscas del grupo **palpalis** mostraron un espectro más amplio de posibles hospedadores. Aunque la mayor parte de las alimentaciones fueron registradas también para suidos salvajes, casi el 20% de los ejemplares de *G. palpalis* se habían alimentado de primates, una tasa similar de bóvidos salvajes y más de un 10% de reptiles. Además se observó que ese patrón era variable en función del foco elegido en el grupo **palpalis**, siendo mucho más restrictivo en el caso de los otros grupos. Estos datos demuestran el alto abanico de posibles hospedadores para *T. b. gambiense*, puesto que *G. p. palpalis* parece ser capaz de adaptarse adecuadamente a la disponibilidad específica de presas. Si quedara demostrada esa misma capacidad de adaptación por parte del parásito a una gran variedad de hospedadores, como muestra *T. b. brucei*, deberíamos actualizar los conceptos que actualmente existen sobre la epidemiología de la THA en África Occidental y reorientar los programas de control en aras a lograr la eliminación total de la enfermedad en la región.

3. Reservorios animales

El mantenimiento de *T. b. gambiense* en reservorios animales podría explicar en gran medida la evolución epidemiológica de los focos históricos de Guinea Ecuatorial.

El papel de la fauna peri-doméstica como reservorio es difícil de demostrar en condiciones naturales. En este sentido, un trabajo publicado en 2005 demostró la capacidad del cerdo doméstico para actuar como potencial reservorio de *T. b. gambiense* (Penchenier *et al.* 2005). Los autores inocularon sangre de un paciente con THA en varios cerdos domésticos (*Sus scrofa*) y monitorizaron parámetros como el peso, anemia y leucocitemia, además de la detección por PCR de los parásitos y el análisis de la respuesta inmunitaria por CATT. Su conclusión fue que *T. b. gambiense* era capaz de sobrevivir al menos durante cuatro meses en este animal sin producir ningún síntoma detectable, lo que le habilitaría como reservorio de la infección al menos durante este período. Pasado ese tiempo, el parásito no se detectaba por técnicas directas aunque permanecía una respuesta serológica (CATT) positiva. Los autores emplearon cerdos para el estudio debido a que varios trabajos atribuyen a esta especie un papel predominante como reservorio animal (Mehlitz 1986; Penchenier *et al.* 1997; Simo *et al.* 2006).

En los focos continentales de Guinea Ecuatorial, a diferencia de otros muchos focos de la subregión, la presencia de ganado porcino es escasa y minoritaria en relación con otras especies, como la oveja o la cabra. Nuestros resultados muestran, no obstante, que a pesar de la posible importancia del cerdo como reservorio de *T. b. gambiense*, otras especies pueden asimismo portar la infección. En nuestro caso, se amplificó ADN de *T. b. gambiense* en muestras de siete animales (cabras y ovejas), lo que supone un 2% de prevalencia total en la fauna doméstica muestreada en Mbini. Existen estudios recientes en los que se ha observado la infección por *T. b. gambiense* en varias especies de fauna doméstica como cabras u ovejas, obteniendo tasas de infección semejantes a las registradas en nuestro estudio y superando la prevalencia en ganado porcino detectada en algunos focos (Njiokou *et al.* 2005; Njiokou *et al.* 2010). Esta variabilidad en el patrón de infección en hospedadores animales, tanto para *T. b. gambiense* como para otros tripanosomas animales, podría ser explicada por la capacidad de *G. p. palpalis* para adaptar sus hábitos alimenticios a las especies disponibles, como ya fue expuesto anteriormente. Adicionalmente, si *T. b. gambiense* estuviera mejor adaptado a los

cerdos domésticos que a otras especies de ganado, es posible que su detección en ellos se viera limitada por una menor parasitemia, como ocurre en el hospedador humano.

En cualquier caso, las diferencias epidemiológicas observadas entre los focos continentales de Kogo y Mbini podrían ser explicadas bajo la consideración de la existencia de reservorios animales de *T. b. gambiense*. La existencia de un ciclo de transmisión ligado a la actividad peri-doméstica en Mbini, favorecido por la participación del ganado local como reservorio de la infección, explicaría la continuidad de la transmisión en humanos a pesar de las periódicas campañas de control focalizadas en el diagnóstico y tratamiento de los casos. Esta hipótesis de un posible ciclo peri-doméstico de transmisión para *T. b. gambiense* ha sido propuesto con anterioridad para focos de otros países como Camerún y Costa de Marfil (Eouzan & Ferrara 1978; Gouteux *et al.* 1982). Esta teoría vendría reforzada por los datos disponibles relacionados con la distribución del vector en la zona, mencionados en apartados anteriores. Mientras en el foco de Kogo se observaron las densidades más altas de *G. p. palpalis* en zonas relativamente distantes de las principales comunidades del distrito (Cano *et al.*, 2007a), en Mbini las zonas de mayor riesgo de contacto hombre-vector se identificaron en zonas circundantes a los poblados (Cano *et al.*, 2007b).

En el foco de Luba, aunque no se han encontrado reservorios animales de *T. b. gambiense*, su existencia es muy probable. La presencia del parásito en el vector y la ausencia de casos de tripanosomiasis humana desde 1995, una vez descartado el reservorio doméstico, nos hace pensar en el posible mantenimiento de *T. b. gambiense* en un ciclo de transmisión salvaje. En este foco, *G. p. palpalis* podría alimentarse fundamentalmente sobre la fauna salvaje, lo que ocasionaría la observada alta prevalencia de *Trypanosoma* sp en el vector y el mantenimiento de *T. b. gambiense* en el foco. No debería excluirse tampoco la posibilidad de que la fauna salvaje pudiera estar interviniendo en el mantenimiento de *T. b. gambiense* en Kogo y Mbini, puesto que en focos del vecino Camerún ha sido descrita la presencia de este parásito en al menos cuatro órdenes de mamíferos: primates, artiodáctilos, roedores y carnívoros (Njiokou *et al.* 2006).

Desde el punto de vista del control, los resultados del presente estudio y los antecedentes relativos a la distribución de las poblaciones vectoras (Cano *et al.* 2007a; Cano *et al.* 2007b), nos sugiere la necesidad de modelos de intervención específicos para cada uno de los focos.

En **Kogo**, la detección activa de casos debería complementarse con actividades de control vectorial en pesquerías y secaderos de pescado, puesto que son las zonas de mayor riesgo de contacto y están exentas de la presencia del ganado doméstico como potencial reservorio.

En **Mbini**, las actividades de control deberían ser intensificadas en el ambiente peri-doméstico. El posible rol de los animales domésticos como reservorios de la infección debería ser cuidadosamente estudiado y tenido en cuenta para valorar la introducción de medidas complementarias de barrera coste-efectivas, como el rociamiento de los animales con insecticidas o la quimioprofilaxis.

En **Luba**, una campaña de control vectorial concentrada en las áreas circundantes a los poblados con mayor densidad de la mosca tsetsé, podría reducir el contacto vector-fauna posibilitando la eliminación permanente del parásito dentro del ciclo epidemiológico, lográndose así la erradicación de la enfermedad en la isla.

El papel epidemiológico de la fauna silvestre debería ser cuidadosamente valorado puesto que la intervención a este nivel entraña mucha más dificultad. Las mencionadas estrategias de control; búsqueda activa de casos, quimioprofilaxis, tratamiento de la infección o el rociamiento de los animales con insecticidas para prevenir las picaduras de mosca tsetsé, no serían viables en un ciclo en el que intervenga la fauna salvaje y por lo tanto, el control vectorial sería la única opción como medida de intervención indirecta.

4. Mecanismos moleculares implicados en la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores

4.1. Crecimiento

El diseño de nuevas estrategias de control adecuadas para la eliminación del parásito debe basarse en un profundo conocimiento sobre su epidemiología, lo que implica la identificación de potenciales reservorios y el conocimiento de los mecanismos que median en la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores, tanto humanos como animales.

Para tratar de realizar un análisis molecular de los mecanismos que regulan el proceso de adaptación a diferentes hospedadores en *T. b. gambiense*, se llevó a cabo una aproximación *in vitro* con una cepa de este parásito adaptada a cultivo.

Nuestros resultados mostraron que *T. b. gambiense* es capaz de crecer en cultivos *in vitro* con los sueros bovino fetal, caprino, porcino y humano. Sin embargo, es necesario mencionar que durante los primeros pasajes hubo una clara ralentización en el crecimiento con los sueros porcinos y caprino. Para la obtención de líneas adaptadas a los diferentes sueros se realizaron tres experimentos independientes con suero de cabra (GS1, GS2 y GS3), tres con suero porcino (PS1, PS2 y PS3) y cuatro con suero humano (HS1, HS2, HS3 y HS4). Después de 25 pases en medio de cultivo con cada uno de esos sueros (75-105 días) el tiempo de generación se redujo significativamente respecto al mostrado por la línea original en los sueros humano y porcino. Las líneas crecidas en suero caprino disminuyeron su tiempo de duplicación de una manera mucho menos drástica que el resto de casos, sugiriendo una adaptación más lenta a este hospedador. Aunque la tasa de crecimiento *in vitro* no es necesariamente un indicador de adaptación, es interesante el hecho de que después de repetidos intentos, no se ha conseguido en nuestro laboratorio una línea viable de *T. b. brucei* en suero caprino ni porcino, incluso partiendo de cepas ya adaptadas a las condiciones de cultivo (datos no publicados).

Después del proceso de adaptación, todas las *líneas celulares adaptadas* (LCAs) mantuvieron su resistencia al suero humano, condición que apunta a la capacidad de seguir infectando al hospedador humano después de pasar por otros reservorios. Numeroso autores han considerado la resistencia de *T. b. gambiense* como un fenómeno constitutivo, al contrario que el caso de *T. b. rhodesiense* (Capewell *et al.* 2011; De *et*

al. 1989; De *et al.* 1992; Vanhamme 2010). No obstante, otros han sugerido un mecanismo de resistencia en *T. b. gambiense* dependiente del sitio de expresión activo, similar al de *T. b. rhodesiense*, (Ortiz *et al.* 1994), aunque la cepa empleada en estos trabajos (TxTat) fue clasificada posteriormente como *T. b. rhodesiense* (Capewell *et al.* 2011; Grab & Kennedy 2008), invalidándose así los resultados.

4.2. Implicación de los sitios de expresión de la VSG

Existen pocos estudios acerca de los mecanismos moleculares implicados en la adaptación de *T. brucei* s.l. a diferentes hospedadores. La mayoría de ellos atribuye esta capacidad a los genes asociados con la variación antigénica (ESAGs) (Bitter *et al.* 1998; Pays *et al.* 2001; van Luenen *et al.* 2005). Esto se debe a que son genes altamente regulados por la expresión mono-alélica de los BESs, fuertemente transcritos por la ARN polimerasa I, con una gran plasticidad genética dada su localización telomérica y, en algunos casos, con importantes polimorfismos entre los alelos de diferentes BESs. La detección de la VSG, proteína de superficie, extremadamente abundante en la célula y co-transcrita con los ESAGs, permite una monitorización rápida de algunas alteraciones en los BESs. Parece existir una tendencia al cambio del BES activo (*switch* in situ) en cultivos de *T. b. brucei* cuando se cambia la especie de la que procede el suero (Bitter *et al.* 1998; van Luenen *et al.* 2005), por lo que es lógico suponer una asociación entre los genes expresados los BES (ESAGs y/o VSG) y la adaptación a diferentes hospedadores. Hasta la fecha, no hay estudios similares llevados a cabo en *T. b. gambiense*.

Empleando anticuerpos específicos desarrollados en esta tesis (frente a la VSG de la línea original –LiTat 2.1- y la de la línea HS1 –LiTat 3.1-) se observó que la mayoría de las LCAs mostraron cambios en la expresión de la VSG. Sólo una de las LCAs de suero humano (HS3) mantuvo la VSG original LiTat 2.1. Aunque globalmente se observaran al menos cinco VSGs diferentes entre las líneas adaptadas, la LiTat 3.1 apareció como predominante en la mayor parte de las LCAs. La facilidad con la que aparece esta VSG en los cultivos con diferentes sueros sugiere que es una de las VSG predominantes, como ocurre en líneas adaptadas a cultivo de *T. b. brucei*. Otra alternativa podría ser la mayor facilidad del parásito para pasar de una VSG concreta a otra (de LiTat 2.1 a LiTat 3.1 en este caso), como ocurre en *T. b. brucei*. Este fenómeno podría explicarse por una mayor capacidad de recombinación entre determinados BESs debido a una mayor homología en sus secuencias, lo que podría facilitar un *switch*, como se sabe que

sucede en *T. b. brucei* (Morrison *et al.* 2005). La aparición de diferentes variantes antigénicas cuando *T. b. gambiense* es sometido a selección en diferentes sueros comparado con la estabilidad antigénica de la línea original sugiere que los BESs llevan a cabo una función esencial en la adaptación de este parásito a los diferentes hospedadores.

No obstante, pese a la tendencia del parásito a cambiar de VSG durante este proceso, es importante señalar que no se encontró una relación clara entre la nueva VSG y la especificidad del suero. Algunos autores han estudiado las VSGs expresadas en *T. vivax* durante su infección en diferentes hospedadores sin encontrar diferencias significativas en la secuencia de aparición en las variantes antigénicas (Barry 1986). Aunque en *T. b. brucei* se ha observado una tendencia al *switch* durante procesos de adaptación, posteriores estudios han atribuido este efecto a la expresión de diferentes ESAGs en lugar de a la propia VSG (Ansorge *et al.* 1999; Mussmann *et al.* 2004; van Luenen *et al.* 2005).

Dada la sospecha de la importancia de los BESs en la adaptación, decidimos realizar un análisis más detallado de su implicación. Para ello, investigamos la variabilidad genotípica de los ESAGs expresados en las diferentes LCAs, ya que se transcriben policistricamente junto con el gen VSG. Los ESAGs han sido estudiados exclusivamente en *T. b. brucei*, aunque la función de la mayoría de ellos es desconocida. Las únicas excepciones son los ESAGs 6 y 7, que codifican el heterodimérico *receptor de transferrina* (TfR). El polimorfismo encontrado entre los numerosos alelos de los genes ESAGs 6 y 7 ha sido propuesto por varios autores como responsable de las diferentes afinidades para la captación de las moléculas de transferrina, también polimórficas, de los diferentes hospedadores mamíferos (Gerrits *et al.* 2002; Steverding 2000). Hay otras evidencias que hacen suponer que los ESAGs 6 y 7 son importantes en la adaptación a los diferentes hospedadores. En primer lugar, existen en todos los BESs conocidos y su localización es siempre muy cercana al promotor, lo que hace posible una transcripción residual de estos genes aunque procedan de BESs inactivos (Ansorge *et al.* 1999). Esta propiedad le permite al parásito tener un mecanismo de compensación cuando pasa de un hospedador a otro, puesto que puede expresar, al menos en parte, el TfR con mayor afinidad para la transferrina del nuevo hospedador.

Además de los ESAGs 6 y 7, escogidos por las particulares características anteriormente mencionadas, decidimos estudiar ESAG3. Este gen se encuentra situado mucho más

lejos del promotor que los ESAGs 6 y 7, lo que permite, junto con las secuencias de estos y la VSG, hacer una somera reconstrucción del proceso de variación antigénica en cada LCA. Aunque su función es desconocida, su secuencia contiene un péptido señal que lo dirige a la membrana plasmática del parásito, lo que sugiere que podría jugar un papel en la interacción celular parásito-hospedador. No hay evidencia de ningún otro dominio funcional, pero aparece en casi todos los BESs de *T. b. brucei* (Hertz-Fowler *et al.* 2008).

Las secuencias obtenidas para los ESAGs 6, 7 y 3 reflejan la diversidad alélica expresada en el momento en el que se extrajo el ARN (puesto que se utilizó cDNA para el genotipaje) y deberían proceder, en caso de existir en ellos, de los BESs activos. No obstante, como revela el genoma de *T. b. brucei*, todos los ESAGs aparecen al menos una vez en otros *loci* genómicos (Berriman *et al.* 2005). Se asumió que este inconveniente fue en gran parte enmascarado por la mayor actividad de la ARN polimerasa I, que transcribe los BESs, comparada con la ARN polimerasa II (Pays *et al.* 1990; Pays *et al.* 2001), que transcribe todos los genes que codifican proteínas excepto los situados en el BES.

4.3. Genotipaje de ESAGs 6 y 7

Los resultados obtenidos reflejaron una baja variabilidad en cuanto a las secuencias de ESAG6 y ESAG7 expresadas en el cADN de las LCAs. Se encontraron cinco genotipos (alelos) de ESAG7 y cuatro de ESAG6. Sorprendentemente, un alineamiento funcional (regiones de unión a transferrina en secuencia de aminoácidos) dio como resultado una reducción importante en el número de tipos de ESAG6 (sólo dos tipos, uno de ellos representado por una única secuencia), mientras que ESAG7 mantuvo cuatro variantes bien diferenciadas. Esta reducida variabilidad de ESAG6 puede estar relacionada con la especialización de *T. b. gambiense* a su hospedador humano, como ha sido propuesto con anterioridad (Young *et al.* 2008), presentando siempre un receptor óptimo para la captación de la transferrina humana independientemente del suero empleado para la adaptación de la línea.

Como se esperaba, no se observó una asociación significativa global en el caso de ESAG6 entre especificidad del suero y el genotipo predominante de cada línea, ni siquiera a nivel de nucleótidos, aunque el genotipo *Tbg6_4* se encontró con más frecuencia en las LCAs porcinas. Esto se debe probablemente a la activación del mismo

sitio de expresión más que a una selección funcional, puesto que a nivel de aminoácido en la región de unión a transferrina todas las LCAs mostraron idéntica secuencia.

ESAG7 mostró una mayor diversidad y una asociación significativa entre suero y alelos expresados. Las LCAs humanas expresaron principalmente el genotipo *Tbg7_1*, mientras que las porcinas mostraron el *Tbg7_5*. *Tbg7_1* también se detectó con frecuencia en LCAs caprina, aunque sin mostrar una asociación específica significativa. *Tbg7_3* no obstante, sí presentó dicha asociación con el suero de cabra, aunque únicamente fue expresado en la línea GS1.

Otros autores mostraron, adaptando *T. b. brucei* a suero canino, que era habitual obtener clones que expresaran un alelo predominante de ESAG7 distinto a la línea original mientras que el genotipo mayoritario de ESAG6 permanecía con frecuencia constante (van Luenen *et al.* 2005), sugiriendo, al igual que nuestros resultados, que la expresión de distintos genotipos de ESAG7 tiene un papel determinante en la adaptación al hospedador.

Posteriormente, procedimos a estudiar si las asociaciones genotipo-suero que habían sido detectadas, tenían una consecuencia funcional en la captación de la transferrina, algo necesario para que pudieran ser consideradas de importancia adaptativa.

4.4. Incorporación de transferrina

La selección genotípica detectada en LCAs de suero humano y porcino puede explicar en parte los resultados obtenidos en los experimentos de incorporación de transferrina humana. Las líneas mantenidas en suero humano y porcino mostraron aproximadamente un 60% más de incorporación de transferrina que las líneas caprinas y bovinas. Estos datos indican que el mantenimiento de los parásitos en un determinado suero puede condicionar su capacidad para incorporar la transferrina de un hospedador distinto. Las líneas adaptadas al suero porcino parecen tener ventaja en la incorporación de la transferrina humana. Además de la selección de alelos específicos anteriormente citada, las diferencias observadas en la captación de la transferrina entre las diferentes LCAs pueden ser debidas a los niveles de expresión de los ESAGs 6 y 7. La transferrina porcina tiene una homología del 78% con la humana, mientras que la bovina comparte el 77% de similitud. Entre la transferrina bovina y porcina hay un 81% de homología. Por lo tanto, no parece que la transferrina porcina sea significativamente más similar a la humana que la bovina. Desgraciadamente no tenemos un conocimiento preciso sobre

los dominios de unión de esta proteína al receptor de *T. brucei*, lo que dificulta comparar las regiones de mayor relevancia para la adaptación y proporcionar una hipótesis más precisa en relación a este punto.

Por otro lado, para comprobar si los niveles de expresión de ESAGs 6 y 7 podían ser determinantes en la incorporación diferencial de transferrina observada entre las LCAs, se midió por PCR cuantitativa de los cADN la expresión relativa de estos dos genes en cada línea. Todas las líneas humanas mostraron un consistente incremento de la expresión de ambos ESAGs en relación a la línea original cultivada en *suero bovino fetal* (SBF), lo que podría explicar su mayor incorporación de transferrina. Este efecto pudo ser el resultado de la selección de los clones con mayor expresión de estos genes a lo largo de la adaptación.

Las LCAs porcinas no mostraron un significativo aumento en la expresión de estos genes en comparación con la línea original, por lo que la incorporación de la transferrina humana parece ser adecuada con el genotipo específico de ESAG7. Por tanto, el TfR seleccionado en las LCAs porcinas parece eficiente en la incorporación de la transferrina humana, lo que podría facilitar el paso de un hospedador a otro.

Sorprendentemente, las LCAs caprinas también mostraron un importante incremento en la expresión de los ESAGs 6 y 7, aunque eso no se tradujo en un aumento en los niveles de incorporación de la transferrina humana. Este efecto pudo deberse a una adaptación incompleta en el suero de cabra, provocando un aumento generalizado en la expresión de todos los BESs inactivos. Esta hipótesis se ve apoyada por la mayor diversidad de genotipos detectada en las pruebas de genotipaje de los ESAGs que se expresan y la menor tasa de crecimiento de estas LCAs.

4.5. Genotipaje de ESAG3

El análisis de las secuencias de los ESAG3 que se expresan en las LCAs reveló una mayor diversidad que en el caso de los ESAGs 6 y 7. Se obtuvieron un total de trece genotipos en el cADN de las LCAs con cuatro regiones claramente polimórficas. Se observó una asociación significativa entre las LCAs humanas y el genotipo *Tbg3_9*, mientras que las porcinas mostraron una significativa preferencia por los alelos *Tbg3_1* y *Tbg3_13*.

El genotipo *Tbg3_9* contiene una tirosina en la posición 183, mientras que prevalece una leucina en el resto de genotipos (excepto *Tbg3_7* y *Tbg3_8*, que sólo se encuentran

en HS1). Aunque ambos son aminoácidos de cadena hidrofóbica, la leucina tiene una gran cadena alifática mientras que la tirosina es un aminoácido aromático y como tal, más rígido en el plegamiento de la proteína. El genotipo *Tbg3_1*, se caracteriza por la presencia del grupo ACNLIARVL (alanina-cisteína-asparagina-leucina-isoleucina-alanina-arginina-leucina) en lugar del usual GGGLIARVW (glicina-glicina-glicina-leucina-isoleucina-alanina-arginina-triptofán) en las posiciones 215-223. Las tres glicinas al inicio del dominio en el resto de genotipos sugieren una enorme flexibilidad de ese epítipo, mucho más reducida en el triplete alanina-cisteína-asparagina, de mayor rigidez. Estas diferencias podrían derivar en un cambio conformacional de la proteína con una importante variación en su funcionalidad. *Tbg3_1* presenta además la particularidad de ser una versión truncada de la proteína al poseer un codón de parada en la posición 233.

El desconocimiento de la función de ESAG3 dificulta enormemente la interpretación de estos resultados. Como comentamos anteriormente, el producto de ESAG3 parece ser una proteína pequeña, sin homología conocida, que contiene un péptido señal que parece conducirla a la membrana del parásito. No obstante, la ausencia de un dominio transmembrana o una cola hidrofóbica C-terminal sugiere que no es una proteína integral de la membrana o anclada a ella vía anclaje *glicofosfatidilinositol* (GPI). Se ha hipotetizado que puede ser secretada o bien unida a la membrana por medio de una asociación con otra proteína, como es el caso de ESAG7 (Pays *et al.* 2001). En este último caso, podría tener una función de receptor de ligandos polimórficos como la transferrina. De otra forma, sólo podemos especular sobre el significado de una proteína secretada en la adaptación a diferentes hospedadores, pero se han descrito otros ejemplos en los que moléculas secretadas juegan un papel fundamental en la interacción entre el organismo patógeno y sus hospedadores. Algunos ejemplos los encontramos en *Plasmodium berghei* (Talman *et al.* 2011), *Fusarium oxysporum* (Thatcher *et al.* 2011), *Sclerotinia sclerotiorum* (Williams *et al.* 2011), *Toxoplasma gondii* (Wiley *et al.* 2011) o *Bacillus anthracis* (Tarlovsky *et al.* 2010). En *Trypanosoma cruzi* se ha observado que una proteína de 21 kDa secretada por amastigotes extracelulares incrementa la capacidad de invasión de estos parásitos en células HeLa (da Silva *et al.* 2009). La calreticulina secretada por *Trypanosoma carassii*, parásito extracelular de peces, se ha sugerido como inhibidora de la vía clásica del complemento por unirse a su primer componente C1q (Oladiran & Belosevic 2010). Asimismo, la expresión diferencial de las proteínas del secretoma ha sido asociada con la variable virulencia de varias cepas

de *T. congolense* (Grebaut *et al.* 2009). El espectro de funciones posibles para ESAG3 parece, por tanto, bastante amplio incluso en el caso de que se tratase de una proteína secretada.

Otra posibilidad que explicaría la asociación de genotipos de ESAG3 con los sueros humano y porcino sería la implicación de otro ESAG en el proceso de adaptación que estuviera localizado en el mismo sitio de expresión que el genotipo correspondiente de ESAG3. Este fenómeno provocaría un sesgo en nuestra percepción de la relación entre genotipos de ESAG3 y el suero específico en el que los parásitos crecieron, ya que habría que atribuir a otro ESAG la implicación en la adaptación. Desgraciadamente, al igual que ocurre con ESAG3, no existe demasiada información disponible respecto a la función del resto de ESAGs.

Los ESAG 1 y 2 no presentan homología con ninguna proteína conocida, parecen ser proteínas de membrana y ambas se localizan en el bolsillo flagelar. ESAG1 es posiblemente un receptor, dado que conserva un grupo de aminoácidos en el dominio putativo extracelular y los motivos endosomales/lisosomales en la cola citoplasmática (Morgan *et al.* 1996). ESAG2 tiene un anclaje en la membrana tipo GPI y presenta las características de la vía endo/exocítica del parásito, como las cadenas pNAL (Nolan *et al.* 1999). ESAG 4 tiene homología con el dominio catalítico de la adenilil ciclasa de levadura y se cree que puede estar implicada en la señalización celular (Pays *et al.* 1989). Un estudio reciente ha mostrado que esta proteína puede estar implicada en el control de la respuesta inmunitaria temprana del hospedador, lo que podría explicar el gran polimorfismo observado (Salmon *et al.* 2012). ESAG 5 presenta un dominio transmembrana y podría, por tanto, ser una proteína integral. Se ha postulado que ESAG 8 puede tener una función de regulación del ciclo celular. La zona N-terminal de la proteína tiene una estructura de anillo de hidrocarburos e inmediatamente una región cargada positivamente que podría tratarse de una secuencia de señalización nuclear (Hoek *et al.* 2000; Lips *et al.* 1996). ESAG 9 y 11 podrían ser proteínas de superficie unidas por anclaje GPI aunque su función es igualmente desconocida. ESAG 10 presenta un dominio transmembrana y tiene homología con un transportador de biopterina de *Leishmania* sp. (Lemley *et al.* 1999; Myler *et al.* 1994).

Así pues, queda patente la necesidad de ampliar la investigación hacia la función de estos genes tan particulares, presentes en zonas teloméricas y que poseen una gran flexibilidad genética.

4.6. Plasticidad en los sitios de expresión

Al observar el agrupamiento de genotipos mayoritarios de los ESAGs 6, 7 y 3 junto con la VSG expresada en cada línea se deduce una gran plasticidad en la expresión de genes procedentes del sitio de expresión.

Los múltiples genotipos de ESAG6/7 observados en LCAs individuales sugieren una expresión residual de los BESs inactivos. Las líneas adaptadas a suero caprino (GS) fueron especialmente proclives a ello. La línea GS1 mostró los cinco genotipos posibles de ESAG7, mientras GS2 y GS3 expresaron dos genotipos distintos de ESAG7 y tres de ESAG6 cada una. La expresión residual de genes cercanos al promotor del sitio de expresión (ESAG6/7) ha sido descrita con anterioridad en *T. b. brucei*, principalmente en condiciones de adaptación (Ansorge *et al.* 1999; van Luenen *et al.* 2005).

De igual modo, los genotipos de ESAG3 parecen ser específicos del hospedador, pero no de la VSG. Los patrones de ESAG3 de las LCAs caprinas también presentan una gran diversidad genotípica, careciendo de un genotipo dominante, incluyendo líneas que expresan VSGs distintas. Es difícil atribuir esta observación a una expresión residual procedente de sitios inactivos, dada la distancia de este gen al promotor del BES. Una posible explicación para estos datos podría ser que algunos BESs observados en este estudio carecieran de copias completas de ESAG3. Algunas LCAs como la bovina, las caprinas o la HS4, mostrarían un patrón diverso de expresión como consecuencia de la expresión de *loci* genómicos sin seleccionar ninguno de ellos. Los genotipos más prevalentes en las LCAs humanas y porcinas podrían ser insertados por conversión génica (posiblemente junto con otros ESAGs) procedentes de otros BESs o copias genómicas favorecida por la homología de secuencia entre los telómeros (Hertz-Fowler *et al.* 2008; Kooter *et al.* 1988). Esta clase de reordenamiento ha sido descrito con anterioridad en *T. b. brucei* al ser cultivado *in vitro* en suero canino y después de haber sido adaptada a HDL humana en un intento de conseguir una población resistente al TLF (Faulkner *et al.* 2006). En *T. b. brucei* existen cinco telómeros sin una copia funcional de ESAG3, incluyendo el BES13/TAR56, que contiene una región del promotor similar a la de todos los BESs de *T. b. gambiense* (Hertz-Fowler *et al.* 2008; Young *et al.* 2008) y en nuestros propios experimentos de adaptación, el genotipo *Tbg3_1* codifica una proteína incompleta.

Aunque algunas copias genómicas de ESAG3 pueden existir como pseudogenes en agrupaciones subteloméricas tanto en *T. b. gambiense* (Jackson *et al.* 2010) como en *T.*

b. brucei (Berriman *et al.* 2005), se espera que los genotipos procedentes de los BESs predominen en el cADN dada la mayor actividad de la ARN polimerasa I. De hecho, el genotipo predominante en las líneas humanas (*Tbg3_9*) corresponde a una copia de un sitio de expresión (TbgBES11) previamente obtenido durante la secuenciación del genoma de *T. b. gambiense* (GenBank AEX08459.1) (Jackson *et al.* 2010). *Tbg3_1*, otro genotipo predominante, preferentemente expresado por PS1 y PS2, comparte un 98% de similitud con el ESAG3 del TbgBES17 (GenBank AEX08464.1). Es interesante que 6 de las 7 sustituciones detectadas entre estos dos genotipos están concentradas en la región polimórfica III, incluyendo el codón de parada exclusivo de este genotipo. *Tbg3_13*, expresado solamente por PS3, también mostró una similitud del 97% con el ESAG3 de TbgBES17, aunque las sustituciones están distribuidas más heterogéneamente que en el caso anterior.

Aunque no se usaron poblaciones clonales en este trabajo, casi todas las líneas expresaron una VSG predominante con más del 80% de frecuencia. La mezcla de poblaciones, especialmente importante en GS3, podría estar sesgando la percepción del patrón de genotipos. No obstante, observando la independencia de la VSG expresada en relación con el suero empleado, se esperarían genotipos predominantes si hubiera una selección fenotípica sobre el gen analizado, como ocurre en las LCAs humanas y porcinas con ESAG7 y ESAG3.

4.7. Eficiencia de los sueros para la adaptación para el crecimiento de *T. b. gambiense*

Los resultados obtenidos muestran importantes diferencias entre las LCAs adaptadas a diferentes sueros. Mientras que las LCAs en suero humano y porcino comparten el bajo tiempo de duplicación, la selección genotípica de ESAG7 y 3 y la alta incorporación de transferrina, las LCAs en suero caprino muestran una tasa de crecimiento significativamente más lenta y una mayor diversidad en el patrón de genotipos expresados. Adicionalmente, a pesar de la elevada expresión de ARN mensajero de ESAG6/7, estas líneas muestran una baja incorporación de transferrina humana. En conjunto, estos datos sugieren que la adaptación a suero caprino es menos eficiente en nuestra cepa de *T. b. gambiense*. La diversidad genotípica y el incremento en ARN mensajero de ESAG6/7 han sido observados en *T. b. brucei* como respuesta inmediata a la adaptación a suero canino, pasando el TfR a distribuirse por toda la superficie

celular en lugar de su usualmente restringida localización en el bolsillo flagelar (Mussmann *et al.* 2004). Esta respuesta parece prolongarse indefinidamente en el suero caprino, sugiriendo una dificultad del parásito para adaptarse a este hospedador. El suero porcino, por el contrario, parece favorecer el crecimiento de *T. b. gambiense* de forma similar al suero humano, manteniendo además una alta capacidad para incorporar la transferrina humana, lo que podría ser un indicativo de la capacidad del parásito para pasar de un hospedador a otro.

Podemos decir que existen evidencias de la implicación de los ESAGs en la adaptación a diferentes reservorios, pero claramente su desconocimiento a nivel funcional supone un serio impedimento en la comprensión de su participación en este proceso. Es necesario emprender estudios más profundos sobre su funcionalidad para comprender completamente su implicación en los procesos de adaptación.

Los datos globales epidemiológicos señalan al cerdo como uno de los principales candidatos a actuar como reservorio para *T. b. gambiense*. Nuestros resultados procedentes de una aproximación *in vitro* apoyan esta hipótesis. Datos derivados de estudios similares en focos del vecino Camerún sitúan la prevalencia de *T. b. gambiense* en ganado porcino en un 18% (Simo *et al.* 2006), muy superior a la tasa de infección observada en nuestro estudio de campo en Guinea Ecuatorial. Esta aparente mayor eficacia del cerdo como reservorio de *T. b. gambiense* podría facilitar el establecimiento y multiplicación del parásito en sangre, lo que podría derivar en una mayor facilidad para contraer la infección después de entrar en contacto con el vector. Sin embargo, no deben ser descartados otros reservorios animales puesto que *T. b. gambiense* ha sido hallado en muchos otros mamíferos (Massussi *et al.* 2010; Njiokou *et al.* 2006; Njiokou *et al.* 2010).

En el caso particular de Guinea Ecuatorial, los cerdos son bastante escasos en la zona continental, lo que podría contribuir a explicar la rapidez con la que se ha reducido el número de casos hasta prácticamente desaparecer la enfermedad, mediante un programa de control basado casi íntegramente en la detección y tratamiento del reservorio humano. En cualquier caso, otros animales como cabras y ovejas se han encontrado infectados. En suero caprino, nuestras LCAs parecieron tener dificultades para adaptarse, pero aun así consiguieron sobrevivir y continuar multiplicándose, lo que habilitaría a esta especie como potencial reservorio.

Este estudio supone el primer análisis molecular de la adaptación *in vitro* de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores. Los resultados obtenidos tanto a nivel

experimental como epidemiológico resaltan la importancia que pueden tener ciertas especies de mamíferos en el mantenimiento de la THA en África Central y Occidental. Estas hipótesis deberían ser tomadas en consideración a la hora de diseñar estrategias de control si se persigue la eliminación de la enfermedad en focos hipo-endémicos.

CONCLUSIONES

1. ***Establecer la frecuencia de infección por *T. brucei* s.l. y otros tripanosomas animales (*T. congolense* Forest, *T. congolense* Savannah y *T. vivax*) en la fauna peridoméstica de los focos continentales de Guinea Ecuatorial (Kogo y Mbini).***

1.1. *T. congolense* Forest es el parásito predominante en la fauna local mientras que el resto de tripanosomas animales tienen una escasa prevalencia, siguiendo un patrón similar al observado en países vecinos.

T. congolense Forest no es el parásito predominante en la fauna local, sino que muestra una prevalencia residual en comparación con *T. b. brucei* en los focos continentales.

1.2. Como se ha observado en otros países de la subregión, la frecuencia de infección por *Trypanosoma* sp es más alta en cerdos que en otras especies animales que forman parte del ganado doméstico.

La frecuencia de infección por *Trypanosoma* sp. no es significativamente mayor en cerdos que en otras especies animales. Si bien es necesario tener en consideración que la escasez de ganado porcino en las zonas de estudio dificulta un análisis estadístico preciso.

2. Analizar el posible papel de la fauna doméstica local como reservorios de la infección por *T. b. gambiense* en los focos endémicos de Guinea Ecuatorial.

2.1. *T. b. gambiense* está presente en una baja prevalencia en la fauna doméstica local de Kogo y Mbini, principalmente en cerdos, tal y como se ha observado en focos del vecino Camerún.

T. b. gambiense fue detectado en cabras y ovejas del foco de Mbini, aunque a una baja prevalencia (2%). No encontramos ningún cerdo infectado por *T. b. gambiense* ni en los focos continentales ni en el foco insular de Luba.

2.2. Teniendo en cuenta las diferencias ecológicas y la variabilidad en los hábitos de vida de las poblaciones humanas asentadas en Kogo y Mbini, esperamos observar diferencias significativas en la frecuencia de infección por *T. b. gambiense* en hospedadores animales entre estos dos focos.

T. b. gambiense fue únicamente hallado en animales domésticos del foco de Mbini. Aunque el parásito no fue detectado en ninguno de los dos focos continentales no podemos descartar un ciclo “salvaje” en el que ciertas especies de animales silvestres pudieran estar participando como reservorios de la infección.

3. Confirmar la eliminación de *T. b. gambiense* y describir las poblaciones de *Glossina palpalis palpalis* del foco insular de Luba (isla de Bioko), analizando el riesgo de una posible reintroducción o rebrote del foco.

3.1 *T. b. gambiense* ha sido eliminado completamente del ciclo epidemiológico en Luba, puesto que desde el año 1995 no se han diagnosticado nuevos casos de la enfermedad en humanos.

T. b. gambiense no ha sido eliminado completamente del ciclo epidemiológico de Luba, puesto que se haya presente en el vector y muy probablemente en la fauna autóctona.

3.2 El vector de la tripanosomiasis en el foco de Luba, *G. p. palpalis*, está presente en la zona y es especialmente abundante en localidades del epicentro del foco.

La población de mosca tsetsé es escasa en casi todos los poblados del foco de Luba. Solamente dos localidades (Bococo Drumen y Bococo Avendaño) albergan importantes poblaciones del vector. Estas localidades son especialmente proclives a un rebrote de la enfermedad, dada su condición rural y sus ecosistemas propicios para la proliferación del vector.

4. Realizar una aproximación a los posibles ciclos epidemiológicos de *T. b. gambiense* existentes en los diferentes focos históricos de Guinea Ecuatorial y recomendar estrategias de control acordes con la situación particular de cada uno.

4.1. La fauna local contribuye al mantenimiento de la infección por *T. b. gambiense* en los focos continentales de Kogo y Mbini, actualmente en fase de eliminación.

Las diferencias epidemiológicas observadas entre los focos de Kogo y Mbini sugieren que existen diferentes ciclos de transmisión en ellos. En Mbini, parece existir un ciclo peri-doméstico en el que participarían como reservorios de *T. b. gambiense* el ganado local, favoreciendo así el mantenimiento del ciclo en humanos a pesar de las intensas actividades de control. En Kogo, sin embargo, la fauna peri-doméstica no parece jugar un papel significativo en el mantenimiento de la transmisión en humanos, que estaría fundamentalmente ligada a la pesca en zonas de alto riesgo de contacto hombre-vector. En ambos focos debería ser considerada la posibilidad de un ciclo de fauna salvaje que estuviera contribuyendo al mantenimiento de la infección.

4.2. Las estrategias de control deben adecuarse a las particularidades epidemiológicas de cada foco.

La presencia de *T. b. gambiense* en animales peri-domésticos del foco de Mbini pone de manifiesto la necesidad del control sobre esos reservorios para evitar el mantenimiento del patógeno en el ciclo epidemiológico. En Kogo y Luba, en principio no parece necesaria esta clase de control y el contacto con el vector podría ser reducido con una campaña anti-vectorial focalizada en las zonas de mayor riesgo. Esta clase de intervención sería, además, la única posible si el parásito estuviera circulando en ciclos salvajes en los que mediara la fauna silvestre.

5. Estudiar los mecanismos moleculares que median en la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores mediante modelos de análisis *in vitro*.

5.1. *T. b. gambiense* es capaz de adaptarse a diferentes sueros animales en los modelos *in vitro* y mantener intacta su capacidad infectiva en humanos.

T. b. gambiense es capaz de crecer *in vitro* al suero de diferentes hospedadores manteniendo su capacidad de sobrevivir al suero humano. No obstante, los sueros porcino y humano demostraron ser más aptos para la adaptación de este parásito.

5.2. La adaptación a los diferentes hospedadores animales está basada en los sitios de expresión del parásito, ya sea a nivel de VSG o de ESAGs.

Aunque se observa que las líneas adaptadas tienden a cambiar su VSG durante el proceso, no se observa una correlación entre la especificidad del suero y la nueva VSG expresada. Sin embargo, se aprecian genotipos específicos de ESAG7 y 3 en las LCAs de suero humano y porcino. El desconocimiento a nivel funcional de los ESAGs supone un gran impedimento para profundizar en la comprensión de estos genes en la adaptación a diferentes hospedadores.

5.3. Los ESAG6/7 (receptor de transferrina) han perdido la variabilidad en *T. b. gambiense* debido a la adaptación a su principal hospedador humano, y como consecuencia de ello no cabe esperar que se dé un proceso de variación antigénica (*switching*) en poblaciones cultivadas *in vitro* cuando se exponen a diferentes sueros animales.

Los ESAG6/7 demostraron tener una baja diversidad genotípica pero existen importantes diferencias cualitativas (selección de genotípica en ESAG7 y ESAG3), cuantitativas (expresión de niveles de ARN mensajero de ESAG6/7) y fenotípicas (eficiencia en la incorporación de transferrina) entre las líneas adaptadas en relación con el suero empleado. Es común la aparición de *switches* aunque el reordenamiento de los sitios de expresión parece ser más complejo que una activación habitual *in situ*.

CONCLUSION FINAL

Este estudio supone el primer análisis *in vitro* de la adaptación de *T. b. gambiense* a diferentes hospedadores. Los resultados obtenidos tanto a nivel experimental como epidemiológico resaltan la importancia que pueden tener ciertas especies de mamíferos en el mantenimiento de la THA en África Central y Occidental. Estas hipótesis deberían ser tomadas en consideración a la hora de diseñar estrategias de control si se persigue la eliminación de la enfermedad en focos hipo-endémicos.

REFERENCIAS

- Abel, P.M., Kiala, G., Loa, V., Behrend, M., Musolf, J., Fleischmann, H., Theophile, J., Krishna, S., & Stich, A. 2004. Retaking sleeping sickness control in Angola. *Trop.Med.Int.Health*, 9, (1) 141-148 available from: PM:14728618
- Aksoy, S., Gibson, W.C., & Lehane, M.J. 2003. Interactions between tsetse and trypanosomes with implications for the control of trypanosomiasis. *Adv.Parasitol.*, 53, 1-83 available from: PM:14587696
- Ansorge, I., Steverding, D., Melville, S., Hartmann, C., & Clayton, C. 1999. Transcription of 'inactive' expression sites in African trypanosomes leads to expression of multiple transferrin receptor RNAs in bloodstream forms. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 101, (1-2) 81-94 available from: PM:10413045
- Asonganyi, T., Doua, F., Kibona, S.N., Nyasulu, Y.M., Masake, R., & Kuzoe, F. 1998. A multi-centre evaluation of the card indirect agglutination test for trypanosomiasis (TrypTect CIATT). *Ann.Trop.Med.Parasitol.*, 92, (8) 837-844 available from: PM:10396343
- Awa, D.N. & Ndamkou, C.N. 2006. Response of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* in zebu cattle in North Cameroon to prophylactic treatment with two formulations of isometamidium. *Prev.Vet.Med.*, 76, (1-2) 90-96 available from: PM:16777250
- Barrett, M.P., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasch, A.C., Cazzulo, J.J., & Krishna, S. 2003. The trypanosomiasis. *Lancet*, 362, (9394) 1469-1480 available from: PM:14602444
- Barry, J.D. 1986. Antigenic variation during *Trypanosoma vivax* infections of different host species. *Parasitology*, 92 (Pt 1), 51-65 available from: PM:2421230
- Becker, M., Aitcheson, N., Byles, E., Wickstead, B., Louis, E., & Rudenko, G. 2004. Isolation of the repertoire of VSG expression site containing telomeres of *Trypanosoma brucei* 427 using transformation-associated recombination in yeast. *Genome Res.*, 14, (11) 2319-2329 available from: PM:15520294

Berberof, M., Perez-Morga, D., & Pays, E. 2001. A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 113, (1) 127-138 available from: PM:11254961

Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D.C., Lennard, N.J., Caler, E., Hamlin, N.E., Haas, B., Bohme, U., Hannick, L., Aslett, M.A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U.C., Arrowsmith, C., Atkin, R.J., Barron, A.J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.J., Churcher, C., Clark, L.N., Corton, C.H., Cronin, A., Davies, R.M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M.C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B.R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A.X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., MacLeod, A., Mooney, P.J., Moule, S., Martin, D.M., Morgan, G.W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C.S., Peterson, J., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Reitter, C., Salzberg, S.L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A.J., Tallon, L., Turner, C.M., Tait, A., Tivey, A.R., Van, A.S., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M.D., Embley, T.M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J.D., Fairlamb, A.H., Opperdoes, F., Barrell, B.G., Donelson, J.E., Hall, N., Fraser, C.M., Melville, S.E., & El-Sayed, N.M. 2005. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*, 309, (5733) 416-422 available from: PM:16020726

Berriman, M., Hall, N., Shearer, K., Bringaud, F., Tiwari, B., Isobe, T., Bowman, S., Corton, C., Clark, L., Cross, G.A., Hoek, M., Zanders, T., Berberof, M., Borst, P., & Rudenko, G. 2002. The architecture of variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 122, (2) 131-140 available from: PM:12106867

Biteau, N., Bringaud, F., Gibson, W., Truc, P., & Baltz, T. 2000. Characterization of Trypanozoon isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 105, (2) 185-201 available from: PM:10693742

Bitter, W., Gerrits, H., Kieft, R., & Borst, P. 1998. The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature*, 391, (6666) 499-502 available from: PM:9461219

- Borst, P., Fase-Fowler, F., & Gibson, W.C. 1987. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 23, (1) 31-38 available from: PM:3033499
- Borst, P., Rudenko, G., Taylor, M.C., Blundell, P.A., Van, L.F., Bitter, W., Cross, M., & McCulloch, R. 1996. Antigenic variation in trypanosomes. *Arch.Med.Res.*, 27, (3) 379-388 available from: PM:8854399
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., & Burri, C. 2010. Human African trypanosomiasis. *Lancet*, 375, (9709) 148-159 available from: PM:19833383
- Brun, R., Hecker, H., & Lun, Z.R. 1998. *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet.Parasitol.*, 79, (2) 95-107 available from: PM:9806490
- Burri, C. & Brun, R. 2003. Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitol.Res.*, 90 Supp 1, S49-S52 available from: PM:12811548
- Cano, J., Descalzo, M.A., Ndong-Mabale, N., Ndong-Asumu, P., Bobuakasi, L., Nzambo-Ondo, S., Benito, A., & Roche, J. 2007a. Predicted distribution and movement of *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Glossinidae) in the wet and dry seasons in the Kogo trypanosomiasis focus (Equatorial Guinea). *J.Vector.Ecol.*, 32, (2) 218-225 available from: PM:18260511
- Cano, J., Descalzo, M.A., Ndong-Mabale, N., Ndong-Asumu, P., Bobuakasi, L., Buatiche, J.N., Nzambo-Ondo, S., Ondo-Esono, M., Benito, A., & Roche, J. 2007b. Spatial and temporal variability of the *Glossina palpalis palpalis* population in the Mbini focus (Equatorial Guinea). *Int J.Health Geogr.*, 6, available from: PM:17760953
- Capewell, P., Veitch, N.J., Turner, C.M., Raper, J., Berriman, M., Hajduk, S.L., & MacLeod, A. 2011. Differences between *Trypanosoma brucei gambiense* Groups 1 and 2 in Their Resistance to Killing by Trypanolytic Factor 1. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, 5, (9) e1287 available from: PM:21909441
- Cattand, P., Jannin, J., & Lucas, P. 2001. Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Trop.Med.Int.Health*, 6, (5) 348-361 available from: PM:11348530
- Chappuis, F., Loutan, L., Simarro, P., Lejon, V., & Buscher, P. 2005. Options for field diagnosis of human african trypanosomiasis. *Clin.Microbiol.Rev.*, 18, (1) 133-146 available from: PM:15653823

- Chappuis, F., Pittet, A., Bovier, P.A., Adams, K., Godineau, V., Hwang, S.Y., Magnus, E., & Buscher, P. 2002. Field evaluation of the CATT/*Trypanosoma brucei gambiense* on blood-impregnated filter papers for diagnosis of human African trypanosomiasis in southern Sudan. *Trop.Med.Int.Health*, 7, (11) 942-948 available from: PM:12390600
- Chappuis, F., Stivanello, E., Adams, K., Kidane, S., Pittet, A., & Bovier, P.A. 2004. Card agglutination test for trypanosomiasis (CATT) end-dilution titer and cerebrospinal fluid cell count as predictors of human African Trypanosomiasis (*Trypanosoma brucei gambiense*) among serologically suspected individuals in southern Sudan. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 71, (3) 313-317 available from: PM:15381812
- Checchi, F., Filipe, J.A., Barrett, M.P., & Chandramohan, D. 2008. The natural progression of gambiense sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, 2, (12) e303 available from: PM:19104656
- Claes, F., Buscher, P., Touratier, L., & Goddeeris, B.M. 2005. *Trypanosoma equiperdum*: master of disguise or historical mistake? *Trends Parasitol.*, 21, (7) 316-321 available from: PM:15923142
- Clausen, P.H., Adeyemi, I., Bauer, B., Breloer, M., Salchow, F., & Staak, C. 1998. Host preferences of tsetse (Diptera: Glossinidae) based on bloodmeal identifications. *Med.Vet.Entomol*, 12, (2) 169-180 available from: PM:9622371
- Connor, R.J. 1994. The impact of nagana. *Onderstepoort J.Vet.Res.*, 61, (4) 379-383 available from: PM:7501369
- Cortez, A.P., Ventura, R.M., Rodrigues, A.C., Batista, J.S., Paiva, F., Anez, N., Machado, R.Z., Gibson, W.C., & Teixeira, M.M. 2006. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*, 133, (Pt 2) 159-169 available from: PM:16650339
- Courtin, F., Jamonneau, V., Duvallet, G., Garcia, A., Coulibaly, B., Doumenge, J.P., Cuny, G., & Solano, P. 2008. Sleeping sickness in West Africa (1906-2006): changes in spatial repartition and lessons from the past. *Trop.Med.Int Health*, 13, (3) 334-344 available from: PM:18397396
- Cox, A., Tilley, A., McOdimba, F., Fyfe, J., Eisler, M., Hide, G., & Welburn, S. 2005. A PCR based assay for detection and differentiation of African trypanosome species in blood. *Exp.Parasitol.*, 111, (1) 24-29 available from: PM:16054487

- Cross, G.A., Wirtz, L.E., & Navarro, M. 1998. Regulation of vsg expression site transcription and switching in *Trypanosoma brucei*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 91, (1) 77-91 available from: PM:9574927
- Da Costa, B. 1916, *Sleeping sickness, a record of four years war against it in Principe, Portuguese West Africa* London, Ballière, Tindall and Cox.
- da Silva, C.V., Kawashita, S.Y., Probst, C.M., Dallagiovanna, B., Cruz, M.C., da Silva, E.A., Souto-Padron, T.C., Krieger, M.A., Goldenberg, S., Briones, M.R., Andrews, N.W., & Mortara, R.A. 2009. Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes.Infect.*, 11, (5) 563-570 available from: PM:19344784
- de Almeida, P.P., Ndao, M., Goossens, B., & Osaer, S. 1998. PCR primer evaluation for the detection of trypanosome DNA in naturally infected goats. *Vet.Parasitol.*, 80, (2) 111-116 available from: PM:9870363
- De Greef C., Chimfwembe, E., Kihang'a, W.J., Bajyana, S.E., & Hamers, R. 1992. Only the serum-resistant bloodstream forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* express the serum resistance associated (SRA) protein. *Ann.Soc.Belg.Med.Trop.*, 72 Suppl 1, 13-21 available from: PM:1417165
- De Raadt, P. 1999, *The history of sleeping sickness* In: Gilles HM, ed. *Protozoal diseases*. London, Arnold.
- De, G.C., Chimfwembe, E., Kihang'a, W.J., Bajyana, S.E., & Hamers, R. 1992. Only the serum-resistant bloodstream forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* express the serum resistance associated (SRA) protein. *Ann.Soc.Belg.Med.Trop.*, 72 Suppl 1, 13-21 available from: PM:1417165
- De, G.C., Imberechts, H., Matthyssens, G., Van, M.N., & Hamers, R. 1989. A gene expressed only in serum-resistant variants of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 36, (2) 169-176 available from: PM:2528066
- Deborggraeve, S. & Buscher, P. 2010. Molecular diagnostics for sleeping sickness: what is the benefit for the patient? *Lancet Infect.Dis.*, 10, (6) 433-439 available from: PM:20510283

Delafosse, A., Thebaud, E., Desquesnes, M., & Michaux, Y. 2006. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. *Prev.Vet.Med.*, 74, (2-3) 108-119 available from: PM:16321453

Desquesnes, M. & Dia, M.L. 2003a. Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Exp.Parasitol.*, 105, (3-4) 226-231 available from: PM:14990316

Desquesnes, M. & Dia, M.L. 2003b. *Trypanosoma vivax*: mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. *Exp.Parasitol.*, 103, (1-2) 35-43 available from: PM:12810044

Desquesnes, M. & Dia, M.L. 2004. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet.Parasitol.*, 119, (1) 9-19 available from: PM:15036572

Desquesnes, M., McLaughlin, G., Zoungrana, A., & Davila, 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, (5-6) 610-614 available from: PM:11334950

Dukes, P., Gibson, W.C., Gashumba, J.K., Hudson, K.M., Bromidge, T.J., Kaukus, A., Asonganyi, T., & Magnus, E. 1992. Absence of the LiTat 1.3 (CATT antigen) gene in *Trypanosoma brucei gambiense* stocks from Cameroon. *Acta Trop.*, 51, (2) 123-134 available from: PM:1354930

Eouzan, J.P. & Ferrara, L. 1978. Comportement péri-domestique de *Glossina palpalis palpalis* dans un foyer de maladie du sommeil au Camerun. *Cah ORSTOM, Sér.Ent.Med.Parasitol.*, 16, 237-242

Farikou, O., Njiokou, F., Simo, G., Asonganyi, T., Cuny, G., & Geiger, A. 2010. Tsetse fly blood meal modification and trypanosome identification in two sleeping sickness foci in the forest of southern Cameroon. *Acta Trop.*, 116, (1) 81-88 available from: PM:20541513

Faulkner, S.D., Oli, M.W., Kieft, R., Cotlin, L., Widener, J., Shiflett, A., Cipriano, M.J., Pacocha, S.E., Birkeland, S.R., Hajduk, S.L., & McArthur, A.G. 2006. In vitro generation of human high-density-lipoprotein-resistant *Trypanosoma brucei brucei*. *Eukaryot.Cell*, 5, (8) 1276-1286 available from: PM:16896212

- Ferreira, F., Cano, J., Furtado, A., Ndong-Mabale, N., Ndong-Asumu, P., Benito, A., Pinto, J., Odete, M.O., Seixas, J., Atougua, J., & Centeno-Lima, S. 2008. An alternative approach to detect *Trypanosoma* in *Glossina* (Diptera, Glossinidae) without dissection. *J Infect Developing Countries*, 1, (2) 63-67
- Fevre, E.M., Picozzi, K., Jannin, J., Welburn, S.C., & Maudlin, I. 2006. Human African trypanosomiasis: Epidemiology and control. *Adv.Parasitol.*, 61, 167-221 available from: PM:16735165
- Field, M.C. & Carrington, M. 2004. Intracellular membrane transport systems in *Trypanosoma brucei*. *Traffic.*, 5, (12) 905-913 available from: PM:15522093
- Frasch, A.C., Hajduk, S.L., Hoeijmakers, J.H., Borst, P., Brunel, E., & Davison, J. 1980. The kinetoplast DNA of *Trypanosoma equiperdum*. *Biochim.Biophys.Acta*, 607, (3) 397-410 available from: PM:6249368
- Funk, S., Nishiura, H., Heesterbeek, H., Edmunds, W.J., & Checchi, F. 2013. Identifying transmission cycles at the human-animal interface: the role of animal reservoirs in maintaining gambiense human african trypanosomiasis. *PLoS.Comput.Biol.*, 9, (1) e1002855 available from: PM:23341760
- Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissiere, C., Lejon, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Van, M.N., & Buscher, P. 2000. Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Cote d'Ivoire: evidence for a complex and heterogeneous population. *Trop.Med.Int.Health*, 5, (11) 786-793 available from: PM:11123826
- Gardiner, P.R. 1989. Recent studies of the biology of *Trypanosoma vivax*. *Adv.Parasitol.*, 28, 229-317 available from: PM:2683616
- Geerts, S., Holmes, P.H., Eisler, M.C., & Diall, O. 2001. African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol.*, 17, (1) 25-28 available from: PM:11137737
- Gerrits, H., Mussmann, R., Bitter, W., Kieft, R., & Borst, P. 2002. The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 119, (2) 237-247 available from: PM:11814575
- Gibson, W. 2007. Resolution of the species problem in African trypanosomes. *Int J Parasitol.*, 37, (8-9) 829-838 available from: PM:17451719

Gibson, W., Borst, P., & Fase-Fowler, F. 1985. Further analysis of intraspecific variation in *Trypanosoma brucei* using restriction site polymorphisms in the maxi-circle of kinetoplast DNA. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 15, (1) 21-36 available from: PM:2985985

Gibson, W., Mehlitz, D., Lanham, S.M., & Godfrey, D.G. 1978. The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberian pigs and dogs by isoenzymes and by resistance to human plasma. *Tropenmed.Parasitol.*, 29, (3) 335-345 available from: PM:726046

Gibson, W., Peacock, L., Ferris, V., Williams, K., & Bailey, M. 2006. Analysis of a cross between green and red fluorescent trypanosomes. *Biochem.Soc.Trans.*, 34, (Pt 4) 557-559 available from: PM:16856859

Gibson, W., Peacock, L., Ferris, V., Williams, K., & Bailey, M. 2008. The use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasit.Vectors.*, 1, (1) 4 available from: PM:18298832

Gibson, W.C., de, C.M.T., & Godfrey, D.G. 1980. Numerical analysis of enzyme polymorphism: a new approach to the epidemiology and taxonomy of trypanosomes of the subgenus *Trypanozoon*. *Adv.Parasitol.*, 18, 175-246 available from: PM:7001872

Gibson, W.C., Stevens, J.R., Mwendia, C.M., Ngotho, J.N., & Ndung'u, J.M. 2001. Unravelling the phylogenetic relationships of African trypanosomes of suids. *Parasitology*, 122, (Pt 6) 625-631 available from: PM:11444615

Gillingwater, K., Mamabolo, M.V., & Majiwa, P.A. 2010. Prevalence of mixed *Trypanosoma congolense* infections in livestock and tsetse in KwaZulu-Natal, South Africa. *J.S.Afr.Vet.Assoc.*, 81, (4) 219-223 available from: PM:21526736

Gouteux, J.P., Dongo, P., & Coulibaly, D. 1982. [Observations on tsetse flies in a forest focus of human trypanosomiasis in Ivory Coast. 3. Dispersal and distribution of fly populations around a village (author's transl)]. *Tropenmed.Parasitol.*, 33, (2) 119-128 available from: PM:6287688

Gouteux, J.P. & Lancien, J. 1986. [The pyramidal trap for collecting and controlling tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Comparative trials and description of new collecting techniques]. *Trop.Med.Parasitol.*, 37, (1) 61-66 available from: PM:3704477

- Grab, D.J. & Kennedy, P.G. 2008. Traversal of human and animal trypanosomes across the blood-brain barrier. *J.Neurovirol.*, 14, (5) 344-351 available from: PM:19016378
- Grebaut, P., Chuchana, P., Brizard, J.P., Demettre, E., Seveno, M., Bossard, G., Jouin, P., Vincendeau, P., Bengaly, Z., Boulange, A., Cuny, G., & Holzmuller, P. 2009. Identification of total and differentially expressed excreted-secreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. *Int.J.Parasitol.*, 39, (10) 1137-1150 available from: PM:19285981
- Guedegbe, B., Verhulst, A., Van, M.N., Pandey, V.S., & Doko, A. 1992. [Serological evidence of the existence of a wild reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Pendjari biosphere reservation in the Republic of Benin]. *Ann.Soc.Belg.Med.Trop.*, 72, (2) 113-120 available from: PM:1417158
- Gull, K. 1999. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. *Annu.Rev.Microbiol.*, 53, 629-655 available from: PM:10547703
- Hargrove, J. 1988. Tsetse: the limits to population growth. *Medical and Veterinary Entomology*, 2, 203-217
- Helm, J.R., Hertz-Fowler, C., Aslett, M., Berriman, M., Sanders, M., Quail, M.A., Soares, M.B., Bonaldo, M.F., Sakurai, T., Inoue, N., & Donelson, J.E. 2009. Analysis of expressed sequence tags from the four main developmental stages of *Trypanosoma congolense*. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 168, (1) 34-42 available from: PM:19559733
- Herder, S., Simo, G., Nkinin, S., & Njiokou, F. 2002. Identification of trypanosomes in wild animals from southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR). *Parasite*, 9, (4) 345-349 available from: PM:12514949
- Hertz-Fowler, C., Figueiredo, L.M., Quail, M.A., Becker, M., Jackson, A., Bason, N., Brooks, K., Churcher, C., Fahkro, S., Goodhead, I., Heath, P., Kartvelishvili, M., Mungall, K., Harris, D., Hauser, H., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Taylor, J.E., Walker, D., White, B., Young, R., Cross, G.A., Rudenko, G., Barry, J.D., Louis, E.J., & Berriman, M. 2008. Telomeric expression sites are highly conserved in *Trypanosoma brucei*. *PLoS.ONE.*, 3, (10) e3527 available from: PM:18953401
- Hide, G. 1999. History of sleeping sickness in East Africa. *Clin.Microbiol.Rev.*, 12, (1) 112-125 available from: PM:9880477

Hide, G. 2008. Visualizing trypanosome sex. *Trends Parasitol.*, 24, (10) 425-428 available from: PM:18692442

Hide, G., Cattand, P., LeRay, D., Barry, J.D., & Tait, A. 1990. The identification of *Trypanosoma brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 39, (2) 213-225 available from: PM:1969612

Hoare, C.A. 1972. *The trypanosomes of mammals.*Oxford: Blackwell Scientific Publications.

Hoek, M., Engstler, M., & Cross, G.A. 2000. Expression-site-associated gene 8 (ESAG8) of *Trypanosoma brucei* is apparently essential and accumulates in the nucleolus. *J.Cell Sci.*, 113 (Pt 22), 3959-3968 available from: PM:11058083

Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S.E., Sachs, J.D., & Savioli, L. 2007. Control of neglected tropical diseases. *N.Engl.J.Med.*, 357, (10) 1018-1027 available from: PM:17804846

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*. *J.Mol.Evol.*, 56, (4) 377-386 available from: PM:12664158

Jackson, A.P., Sanders, M., Berry, A., McQuillan, J., Aslett, M.A., Quail, M.A., Chukualim, B., Capewell, P., MacLeod, A., Melville, S.E., Gibson, W., Barry, J.D., Berriman, M., & Hertz-Fowler, C. 2010. The genome sequence of *Trypanosoma brucei gambiense*, causative agent of chronic human african trypanosomiasis. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, 4, (4) e658 available from: PM:20404998

Jamonneau, V., Ravel, S., Koffi, M., Kaba, D., Zeze, D.G., Ndri, L., Sane, B., Coulibaly, B., Cuny, G., & Solano, P. 2004. Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Cote d'Ivoire. *Parasitology*, 129, (Pt 6) 693-702 available from: PM:15648692

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. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 73, (3) 491-495 available from: PM:16172469

- Joshua, R.A. 1989. Occurrence of human serum-resistant *Trypanosoma congolense* in goats and sheep in Nigeria. *Vet.Parasitol.*, 31, (2) 107-113 available from: PM:2741299
- Kabiri, M., Franco, J.R., Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Sarsa, M., & Steverding, D. 1999. Detection of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness suspects by PCR amplification of expression-site-associated genes 6 and 7. *Trop.Med.Int.Health*, 4, (10) 658-661 available from: PM:10583899
- Koffi, M., de, M.T., Bucheton, B., Solano, P., Camara, M., Kaba, D., Cuny, G., Ayala, F.J., & Jamonneau, V. 2009. Population genetics of *Trypanosoma brucei gambiense*, the agent of sleeping sickness in Western Africa. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 106, (1) 209-214 available from: PM:19106297
- Koffi, M., Solano, P., Denizot, M., Courtin, D., Garcia, A., Lejon, V., Buscher, P., Cuny, G., & Jamonneau, V. 2006. Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop.*, 98, (2) 183-188 available from: PM:16723098
- Kohagne, T.L., Mengue, M.P., Mimpfoundi, R., & Louis, F.J. 2010. [Glossina feeding habits and diversity of species of trypanosomes in an active focus of human African trypanosomiasis in Gabon]. *Bull.Soc.Pathol.Exot.*, 103, (4) 264-271 available from: PM:20821180
- Kooter, J.M., Winter, A.J., de, O.C., Wagter, R., & Borst, P. 1988. Boundaries of telomere conversion in *Trypanosoma brucei*. *Gene*, 69, (1) 1-11 available from: PM:3224817
- Kristjanson, P.M., Swallow, B.M., Rowlands, G.J., Kruska, R.L., & de Leeuw, P.N. 1999. Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of control and returns to research. *Agricultural Systems*, 59, 79-98
- Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di, C.F., Grab, D.J., Suzuki, H., Sugimoto, C., & Igarashi, I. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J.Clin.Microbiol.*, 41, (12) 5517-5524 available from: PM:14662933
- Kuzoe, F.A.S. & Schofield, C.J. 2004. Strategic review of traps and targets for tsetse and African Trypanosomiasis control. *Report of Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR)*, TDR/IDE/TRY/05.1,

- Larionov, V., Kouprina, N., Eldarov, M., Perkins, E., Porter, G., & Resnick, M.A. 1994. Transformation-associated recombination between diverged and homologous DNA repeats is induced by strand breaks. *Yeast*, 10, (1) 93-104 available from: PM:8203155
- Laveissiere, C. & Hervouet, J.P. 1991. Trypanosomiase humaine en Afrique de l'ouest: Epidémiologie et contrôle. *OSTROM Collection Didactique* 157
- Leak, S.G., Colardelle, C., D'Ieteren, G., Dumont, P., Feron, A., Jeannin, P., Minengu, M., Mulungu, M., Ngamuna, S., Ordner, G., & . 1991. Glossina fusca group tsetse as vectors of cattle trypanosomiasis in Gabon and Zaire. *Med.Vet.Entomol.*, 5, (1) 111-120 available from: PM:1768890
- Lehane, M.J., Msangi, A.R., Whitaker, C.J., & Lehane, S.M. 2000. Grouping of trypanosome species in mixed infections in Glossina pallidipes. *Parasitology*, 120 (Pt 6), 583-592 available from: PM:10874721
- Lemley, C., Yan, S., Dole, V.S., Madhubala, R., Cunningham, M.L., Beverley, S.M., Myler, P.J., & Stuart, K.D. 1999. The Leishmania donovani LD1 locus gene ORFG encodes a biopterin transporter (BT1). *Mol.Biochem.Parasitol.*, 104, (1) 93-105 available from: PM:10589984
- Li, F.J., Gasser, R.B., Lai, D.H., Claes, F., Zhu, X.Q., & Lun, Z.R. 2007. PCR approach for the detection of Trypanosoma brucei and T. equiperdum and their differentiation from T. evansi based on maxicircle kinetoplast DNA. *Mol.Cell Probes*, 21, (1) 1-7 available from: PM:16806809
- Lips, S., Geuskens, M., Paturiaux-Hanocq, F., Hanocq-Quertier, J., & Pays, E. 1996. The esag 8 gene of Trypanosoma brucei encodes a nuclear protein. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 79, (1) 113-117 available from: PM:8844679
- Louis, F.J., Kohagne, T.L., Ebo'O, E., V, & Simarro, P.P. 2008. [Organizing an active screening campaign for human african trypanosomiasis due to Trypanosoma brucei gambiense]. *Med.Trop.(Mars.)*, 68, (1) 11-16 available from: PM:18478763
- Louis, F.J., Simarro, P.P., & Lucas, P. 2002. [Sleeping sickness: one hundred years of control strategy evolution]. *Bull.Soc.Pathol.Exot.*, 95, (5) 331-336 available from: PM:12696370

- 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, (2) 189-196 available from: PM:1311051
- Lutumba, P., Robays, J., Miaka mia, B.C., Mesu, V.K., Molisho, D., Declercq, J., Van, d., V, Meheus, F., Jannin, J., & Boelaert, M. 2005. Trypanosomiasis control, Democratic Republic of Congo, 1993-2003. *Emerg.Infect Dis.*, 11, (9) 1382-1388 available from: PM:16229766
- MacLeod, A., Tait, A., & Turner, C.M. 2001. The population genetics of *Trypanosoma brucei* and the origin of human infectivity. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 356, (1411) 1035-1044 available from: PM:11516381
- MacLeod, A., Turner, C.M., & Tait, A. 1999. A high level of mixed *Trypanosoma brucei* infections in tsetse flies detected by three hypervariable minisatellites. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 102, (2) 237-248 available from: PM:10498180
- MacLeod, A., Tweedie, A., Welburn, S.C., Maudlin, I., Turner, C.M., & Tait, A. 2000. Minisatellite marker analysis of *Trypanosoma brucei*: reconciliation of clonal, panmictic, and epidemic population genetic structures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97, (24) 13442-13447 available from: PM:11078512
- Magnus, E., Lejon, V., Bayon, D., Buyse, D., Simarro, P., Verloo, D., Vervoort, T., Pansaerts, R., Buscher, P., & Van, M.N. 2002. Evaluation of an EDTA version of CATT/*Trypanosoma brucei gambiense* for serological screening of human blood samples. *Acta Trop.*, 81, (1) 7-12 available from: PM:11755427
- Magnus, E., Vervoort, T., & Van, M.N. 1978. A card-agglutination test with stained trypanosomes (C.A.T.T.) for the serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. *Ann.Soc.Belg.Med.Trop.*, 58, (3) 169-176 available from: PM:747425
- Makumyaviri, A., Mehlitz, D., Kageruka, P., Kazyumba, G.L., & Molisho, D. 1989. [Animal reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in Zaire: trypanosome infections in two foci in Bas-Zaire]. *Trop.Med.Parasitol.*, 40, (3) 258-262 available from: PM:2617030
- Masiga, D.K., McNamara, J.J., Laveissiere, C., Truc, P., & Gibson, W.C. 1996. A high prevalence of mixed trypanosome infections in tsetse flies in Sinfra, Cote d'Ivoire,

detected by DNA amplification. *Parasitology*, 112 (Pt 1), 75-80 available from: PM:8587804

Maslov, D.A., Podlipaev, S.A., & Lukes, J. 2001. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 96, (3) 397-402 available from: PM:11313652

Massussi, J.A., Massussi, J.A., Mbida Mbida, J.A., Djieto-Lordon, C., Njiokou, F., Laveissiere, C., & van der Ploeg, J.D. 2010. Diversity and spatial distribution of vectors and hosts of *T. brucei gambiense* in forest zones of, Southern Cameroon: epidemiological implications. *Acta Trop.*, 114, (1) 44-48 available from: PM:20067756

McCulloch, R. & Horn, D. 2009. What has DNA sequencing revealed about the VSG expression sites of African trypanosomes? *Trends Parasitol.*, 25, (8) 359-363 available from: PM:19632154

McNamara, J.J., Laveissiere, C., & Masiga, D.K. 1995. Multiple trypanosome infections in wild tsetse in Cote d'Ivoire detected by PCR analysis and DNA probes. *Acta Trop.*, 59, (2) 85-92 available from: PM:7676910

Mehlitz, D. 1986. Le reservoir Animal de la Maladie du Sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. *Etudes et Synthèses de L'I.E.M.V.T.*

Mehlitz, D., Zillmann, U., Scott, C.M., & Godfrey, D.G. 1982. Epidemiological studies on the animal reservoir of Gambiense sleeping sickness. Part III. Characterization of trypanozoon stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed.Parasitol.*, 33, (2) 113-118 available from: PM:6287687

Mihok, S., Maramba, O., Munyoki, E., & Kagoiya, J. 1995. Mechanical transmission of *Trypanosoma* spp. by African Stomoxyinae (Diptera: Muscidae). *Trop.Med.Parasitol.*, 46, (2) 103-105 available from: PM:8525279

Moloo, S.K. & Kutuza, S.B. 1988. Comparative study on the infection rates of different laboratory strains of *Glossina* species by *Trypanosoma congolense*. *Med.Vet.Entomol.*, 2, (3) 253-257 available from: PM:2980181

Morgan, R.W., El-Sayed, N.M., Kepa, J.K., Pedram, M., & Donelson, J.E. 1996. Differential expression of the expression site-associated gene I family in African trypanosomes. *J.Biol.Chem.*, 271, (16) 9771-9777 available from: PM:8621657

- Morlais, I., Grebaut, P., Bodo, J.M., Djoha, S., & Cuny, G. 1998a. Characterization of trypanosome infections by polymerase chain reaction (PCR) amplification in wild tsetse flies in Cameroon. *Parasitology*, 116 (Pt 6), 547-554 available from: PM:9651938
- Morlais, I., Grebaut, P., Bodo, J.M., Djoha, S., Cuny, G., & Herder, S. 1998b. Detection and identification of trypanosomes by polymerase chain reaction in wild tsetse flies in Cameroon. *Acta Trop.*, 70, (1) 109-117 available from: PM:9707369
- Morrison, L.J., Majiwa, P., Read, A.F., & Barry, J.D. 2005. Probabilistic order in antigenic variation of *Trypanosoma brucei*. *Int.J.Parasitol.*, 35, (9) 961-972 available from: PM:16000200
- Morrison, L.J., Tait, A., McCormack, G., Sweeney, L., Black, A., Truc, P., Likeufack, A.C., Turner, C.M., & MacLeod, A. 2008. *Trypanosoma brucei gambiense* Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Infect Genet.Evol.*, 8, (6) 847-854 available from: PM:18790085
- Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs, D.E., Bailey, C.P., McKane, M.R., & Donelson, J.E. 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology*, 99 Pt 1, 57-66 available from: PM:2797872
- Mullis, K.B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann.Biol.Clin.(Paris)*, 48, (8) 579-582 available from: PM:2288446
- Musmann, R., Engstler, M., Gerrits, H., Kieft, R., Toaldo, C.B., Onderwater, J., Koerten, H., van Luenen, H.G., & Borst, P. 2004. Factors affecting the level and localization of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei*. *J.Biol.Chem.*, 279, (39) 40690-40698 available from: PM:15263009
- Myler, P.J., Lodes, M.J., Merlin, G., de, V.T., & Stuart, K.D. 1994. An amplified DNA element in *Leishmania* encodes potential integral membrane and nucleotide-binding proteins. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 66, (1) 11-20 available from: PM:7984172
- Nantulya, V.M. 1989. An antigen detection enzyme immunoassay for the diagnosis of rhodesiense sleeping sickness. *Parasite Immunol.*, 11, (1) 69-75 available from: PM:2927956

- Nantulya, V.M. 1997. TrypTect CIATT--a card indirect agglutination trypanosomiasis test for diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and *T. b. rhodesiense* infections. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 91, (5) 551-553 available from: PM:9463665
- Nantulya, V.M., Doua, F., & Molisho, S. 1992. Diagnosis of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness using an antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 86, (1) 42-45 available from: PM:1566302
- Ndegwa, P.N., Irungu, L.W., & Moloo, S.K. 1992. Effect of puparia incubation temperature: increased infection rates of *Trypanosoma congolense* in *Glossina morsitans centralis*, *G. fuscipes fuscipes* and *G. brevipalpis*. *Med.Vet.Entomol.*, 6, (2) 127-130 available from: PM:1421481
- Ng'ayo, M.O., Njiru, Z.K., Kenya, E.U., Muluvi, G.M., Osir, E.O., & Masiga, D.K. 2005. Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya: important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness? *Kinetoplastid.Biol.Dis.*, 4, 5 available from: PM:16018802
- Njiokou, F., Laveissiere, C., Simo, G., Nkinin, S., Grebaut, P., Cuny, G., & Herder, S. 2006. Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infect.Genet.Evol.*, 6, (2) 147-153 available from: PM:16236560
- Njiokou, F., Nimpaye, H., Simo, G., Njitchouang, G.R., Asonganyi, T., Cuny, G., & Herder, S. 2010. Domestic animals as potential reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in sleeping sickness foci in Cameroon. *Parasite*, 17, (1) 61-66 available from: PM:20387740
- Njiokou, F., Sima, F.O., Njitchouang, G.R., Nimpaye, H., Cuny, G., & Herder, S. 2005. Importance of domestic animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *28th Meeting ISCTRC Addis Ababa, Ethiopia*
- Njiru, Z.K., Mikosza, A.S., Matovu, E., Enyaru, J.C., Ouma, J.O., Kibona, S.N., Thompson, R.C., & 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, (5) 589-599 available from: PM:17991469
- Njiru, Z.K., Ndung'u, K., Matete, G., Ndungu, J.M., & Gibson, W.C. 2004. Detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* in animals from sleeping sickness foci in East Africa

using the serum resistance associated (SRA) gene. *Acta Trop.*, 90, (3) 249-254 available from: PM:15099811

Nolan, D.P., Geuskens, M., & Pays, E. 1999. N-linked glycans containing linear poly-N-acetyllactosamine as sorting signals in endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *Curr.Biol.*, 9, (20) 1169-1172 available from: PM:10531030

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28, (12) E63 available from: PM:10871386

Odiit, M., Coleman, P.G., Liu, W.C., McDermott, J.J., Fevre, E.M., Welburn, S.C., & Woolhouse, M.E. 2005. Quantifying the level of under-detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness cases. *Trop.Med.Int.Health*, 10, (9) 840-849 available from: PM:16135190

Oladiran, A. & Belosevic, M. 2010. *Trypanosoma carassii* calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis. *Dev.Comp Immunol.*, 34, (4) 396-405 available from: PM:19913050

Opperdoes, F.R. & Borst, P. 1977. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.*, 80, (2) 360-364 available from: PM:142663

Ortiz, J.C., Sechelski, J.B., & Seed, J.R. 1994. Characterization of human serum-resistant and serum-sensitive clones from a single *Trypanosoma brucei gambiense* parental clone. *J.Parasitol.*, 80, (4) 550-557 available from: PM:8064522

Osorio, A.L., Madruga, C.R., Desquesnes, M., Soares, C.O., Ribeiro, L.R., & Costa, S.C. 2008. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 103, (1) 1-13 available from: PM:18368231

Paindavoine, P., Pays, E., Laurent, M., Geltmeyer, Y., Le, R.D., Mehlitz, D., & Steinert, M. 1986. The use of DNA hybridization and numerical taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. *Parasitology*, 92 (Pt 1), 31-50 available from: PM:3960593

- Pansaerts, R., Van, M.N., Magnus, E., & Verhelst, L. 1998. Increased sensitivity of the card agglutination test CATT/*Trypanosoma brucei gambiense* by inhibition of complement. *Acta Trop.*, 70, (3) 349-354 available from: PM:9777719
- Parsons, M. 2004. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol.Microbiol.*, 53, (3) 717-724 available from: PM:15255886
- Pays, E. 2005. Regulation of antigen gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Parasitol.*, 21, (11) 517-520 available from: PM:16126458
- Pays, E., Coquelet, H., Tebabi, P., Pays, A., Jefferies, D., Steinert, M., Koenig, E., Williams, R.O., & Roditi, I. 1990. *Trypanosoma brucei*: constitutive activity of the VSG and procyclin gene promoters. *EMBO J.*, 9, (10) 3145-3151 available from: PM:1698609
- Pays, E., Lips, S., Nolan, D., Vanhamme, L., & Perez-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) 1-16 available from: PM:11356509
- Pays, E., Tebabi, P., Pays, A., Coquelet, H., Revelard, P., Salmon, D., & Steinert, M. 1989. The genes and transcripts of an antigen gene expression site from *T. brucei*. *Cell*, 57, (5) 835-845 available from: PM:2720787
- Pays, E. & Vanhollebeke, B. 2008. Mutual self-defence: the trypanolytic factor story. *Microbes.Infect.*, 10, (9) 985-989 available from: PM:18675374
- Penchenier, L., Alhadji, D., Bahebegue, S., Simo, G., Laveissiere, C., & Cuny, G. 2005. Spontaneous cure of domestic pigs experimentally infected by *Trypanosoma brucei gambiense*. Implications for the control of sleeping sickness. *Vet.Parasitol.*, 133, (1) 7-11 available from: PM:16076528
- Penchenier, L., Mathleu-Daude, F., Brengues, C., Banuls, A.L., & Tibayrenc, M. 1997. Population structure of *Trypanosoma brucei* S. L. in Cote d'Ivoire assayed by multilocus enzyme electrophoresis: epidemiological and taxonomical considerations. *J.Parasitol.*, 83, (1) 19-22 available from: PM:9057691
- Picozzi, K., Carrington, M., & Welburn, S.C. 2008. A multiplex PCR that discriminates between *Trypanosoma brucei brucei* and zoonotic *T. b. rhodesiense*. *Exp.Parasitol.*, 118, (1) 41-46 available from: PM:17643434

- Picozzi, K., Fevre, E.M., Odiit, M., Carrington, M., Eisler, M.C., Maudlin, I., & Welburn, S.C. 2005. Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *BMJ*, 331, (7527) 1238-1241 available from: PM:16308383
- Radwanska, M., Chamekh, M., Vanhamme, L., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., De, B.P., Buscher, P., & Pays, E. 2002a. The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 67, (6) 684-690 available from: PM:12518862
- Radwanska, M., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., Perez-Morga, D., Pays, E., & Buscher, P. 2002b. Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 67, (3) 289-295 available from: PM:12408669
- Ralston, K.S. & Hill, K.L. 2008. The flagellum of *Trypanosoma brucei*: new tricks from an old dog. *Int.J.Parasitol.*, 38, (8-9) 869-884 available from: PM:18472102
- Robays, J., Bilengue, M.M., Van der, S.P., & Boelaert, M. 2004. The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Trop.Med.Int.Health*, 9, (5) 542-550 available from: PM:15117297
- Roditi, I. & Lehane, M.J. 2008. Interactions between trypanosomes and tsetse flies. *Curr.Opin.Microbiol.*, 11, (4) 345-351 available from: PM:18621142
- Rogers, D.J. 1988. A general model for the African trypanosomiases. *Parasitology*, 97 (Pt 1), 193-212 available from: PM:3174235
- Salmon, D., Vanwalleghem, G., Morias, Y., Denoëud, J., Krumbholz, C., Lhomme, F., Bachmaier, S., Kador, M., Gossmann, J., Dias, F.B., De, M.G., Uzureau, P., Magez, S., Moser, M., De, B.P., Van Den Abbeele, J., Beschin, A., Boshart, M., & Pays, E. 2012. Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science*, 337, (6093) 463-466 available from: PM:22700656
- Sane, B., Laveissiere, C., & Meda, H.A. 2000. [Diversity of feeding behavior of *Glossina palpalis palpalis* in the forest belt of the Ivory Coast: relation to the prevalence of human African trypanosomiasis]. *Trop.Med.Int Health*, 5, (1) 73-78 available from: PM:10672209

Schell, D., Borowy, N.K., & Overath, P. 1991. Transferrin is a growth factor for the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol.Res.*, 77, (7) 558-560 available from: PM:1792224

Schmid, C., Richer, M., Bilenge, C.M., Josenando, T., Chappuis, F., Manthelot, C.R., Nangouma, A., Doua, F., Asumu, P.N., Simarro, P.P., & Burri, C. 2005. Effectiveness of a 10-day melarsoprol schedule for the treatment of late-stage human African trypanosomiasis: confirmation from a multinational study (IMPAMEL II). *J.Infect.Dis.*, 191, (11) 1922-1931 available from: PM:15871127

Shaw, A.P. 2009. Assessing the economics of animal trypanosomosis in Africa--history and current perspectives. *Onderstepoort J.Vet.Res.*, 76, (1) 27-32 available from: PM:19967925

Simarro, P.P., Cecchi, G., Franco, J.R., Paone, M., Diarra, A., Ruiz-Postigo, J.A., Fevre, E.M., Mattioli, R.C., & Jannin, J.G. 2012. Estimating and mapping the population at risk of sleeping sickness. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, 6, (10) e1859 available from: PM:23145192

Simarro, P.P., Cecchi, G., Paone, M., Franco, J.R., Diarra, A., Ruiz, J.A., Fevre, E.M., Courtin, F., Mattioli, R.C., & Jannin, J.G. 2010. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int.J.Health Geogr.*, 9, 57 available from: PM:21040555

Simarro, P.P., Diarra, A., Ruiz Postigo, J.A., Franco, J.R., & Jannin, J.G. 2011. The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, 5, (2) e1007 available from: PM:21364972

Simarro, P.P., Franco, J.R., Ndong, P., Nguema, E., Louis, F.J., & Jannin, J. 2006. The elimination of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Trop.Med.Int.Health*, 11, (5) 636-646 available from: PM:16640616

Simarro, P.P., Jannin, J., & Cattand, P. 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS.Med.*, 5, (2) e55 available from: PM:18303943

- Simarro, P.P., Mas, J., Lancien, J., Ona, S.F., Mateo, M.J., & Roche, J. 1990. [Epidemiology of human trypanosomiasis in the Luba focus, in Equatorial Guinea]. *Rev.Sanid.Hig.Publica (Madr.)*, 64, (9-10) 517-534 available from: PM:2131631
- Simarro, P.P., Ruiz, J.A., Franco, J.R., & Josenando, T. 1999. Attitude towards CATT-positive individuals without parasitological confirmation in the African Trypanosomiasis (*T.b. gambiense*) focus of Quicama (Angola). *Trop.Med.Int Health*, 4, (12) 858-861 available from: PM:10632994
- Simarro, P.P., Sima, F.O., Mir, M., Mateo, M.J., & Roche, J. 1991. [Control of human African trypanosomiasis in Luba in equatorial Guinea:evaluation of three methods]. *Bull World Health Organ*, 69, (4) 451-457 available from: PM:1934239
- Simarro, P. P., Sima, F. O., & Vitalta, M. M. 1988, *Epidemiology of sleeping sickness in Equatorial Guinea* OAU/STRC vol. 13, no. 6053, pp. 196-204.
- Simo, G., Asonganyi, T., Nkinin, S.W., Njiokou, F., & Herder, S. 2006. High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. *Vet.Parasitol.*, 139, (1-3) 57-66 available from: PM:16567049
- Simo, G., Njiokou, F., Mbida Mbida, J.A., Njitchouang, G.R., Herder, S., Asonganyi, T., & Cuny, G. 2008. Tsetse fly host preference from sleeping sickness foci in Cameroon: epidemiological implications. *Infect.Genet.Evol.*, 8, (1) 34-39 available from: PM:17977803
- Simo, G., Njitchouang, G.R., Njiokou, F., Cuny, G., & Asonganyi, T. 2011. *Trypanosoma brucei* s.l.: Microsatellite markers revealed high level of multiple genotypes in the mid-guts of wild tsetse flies of the Fontem sleeping sickness focus of Cameroon. *Exp.Parasitol.*, 128, (3) 272-278 available from: PM:21376044
- Smith, D.H., Pepin, J., & Stich, A.H. 1998. Human African trypanosomiasis: an emerging public health crisis. *Br.Med.Bull.*, 54, (2) 341-355 available from: PM:9830201
- Solano, P., Michel, J.F., Lefrancois, T., de La, R.S., Sidibe, I., Zoungrana, A., & Cuisance, D. 1999. Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. *Vet.Parasitol.*, 86, (2) 95-103 available from: PM:10496693

- Spath, J. 2000. Feeding patterns of three sympatric tsetse species (*Glossina* spp.) (Diptera: Glossinidae) in the preforest zone of Cote d'Ivoire. *Acta Trop.*, 75, (1) 109-118 available from: PM:10708012
- Stevens, J.R. & Godfrey, D.G. 1992. Numerical taxonomy of Trypanozoon based on polymorphisms in a reduced range of enzymes. *Parasitology*, 104 Pt 1, 75-86 available from: PM:1614742
- Steverding, D. 2000. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol.Int.*, 48, (3) 191-198 available from: PM:11227758
- Steverding, D. 2008. The history of African trypanosomiasis. *Parasit.Vectors.*, 1, (1) 3 available from: PM:18275594
- Sumba, A.L., Mihok, S., & Oyieke, F.A. 1998. Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. *Med.Vet.Entomol.*, 12, (4) 417-422 available from: PM:9824826
- Talman, A.M., Lacroix, C., Marques, S.R., Blagborough, A.M., Carzaniga, R., Menard, R., & Sinden, R.E. 2011. PbGEST mediates malaria transmission to both mosquito and vertebrate host. *Mol.Microbiol.*, 82, (2) 462-474 available from: PM:21958024
- Tarlovsy, Y., Fabian, M., Solomaha, E., Honsa, E., Olson, J.S., & Maresso, A.W. 2010. A *Bacillus anthracis* S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC. *J.Bacteriol.*, 192, (13) 3503-3511 available from: PM:20435727
- Thatcher, L.F., Gardiner, D.M., Kazan, K., & Manners, J. 2011. A Highly Conserved Effector in *Fusarium oxysporum* is Required for Full Virulence on *Arabidopsis*. *Mol.Plant Microbe Interact.* available from: PM:21942452
- Truc, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., N'Dri, L., Diallo, P.B., & Cuny, G. 1998. *Trypanosoma brucei* ssp. and *T. congolense*: mixed human infection in Cote d'Ivoire. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 92, (5) 537-538 available from: PM:9861372
- Truc, P., Lejon, V., Magnus, E., Jamonneau, V., Nangouma, A., Verloo, D., Penchenier, L., & Buscher, P. 2002. Evaluation of the micro-CATT, CATT/*Trypanosoma brucei gambiense*, and LATEX/*T. b. gambiense* methods for serodiagnosis and surveillance of human African trypanosomiasis in West and Central Africa. *Bull.World Health Organ*, 80, (11) 882-886 available from: PM:12481210

- van Luenen, H.G., Kieft, R., Mussmann, R., Engstler, M., ter, R.B., & Borst, P. 2005. Trypanosomes change their transferrin receptor expression to allow effective uptake of host transferrin. *Mol.Microbiol.*, 58, (1) 151-165 available from: PM:16164555
- Vanhamme, L. 2010. The human trypanolytic factor: a drug shaped naturally. *Infect.Disord.Drug Targets.*, 10, (4) 266-282 available from: PM:20429865
- 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, (26) 2752-2756 available from: PM:17192540
- Vreysen, M.J., Saleh, K.M., Ali, M.Y., Abdulla, A.M., Zhu, Z.R., Juma, K.G., Dyck, V.A., Msangi, A.R., Mkonyi, P.A., & Feldmann, H.U. 2000. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J.Econ.Entomol*, 93, (1) 123-135 available from: PM:14658522
- Waiswa, C., Olaho-Mukani, W., & Katunguka-Rwakishaya, E. 2003. Domestic animals as reservoirs for sleeping sickness in three endemic foci in south-eastern Uganda. *Ann.Trop.Med.Parasitol.*, 97, (2) 149-155 available from: PM:12803870
- Wang, Z.L. 1988. The similarities and differences of the characteristics between *T. equiperdum* and *T. evansi*. *Bul.Vet.Col.(PLA) (Chinese)* (8) 300-303
- Welburn, S.C., Coleman, P.G., Maudlin, I., Fevre, E.M., Odiit, M., & Eisler, M.C. 2006. Crisis, what crisis? Control of Rhodesian sleeping sickness. *Trends Parasitol.*, 22, (3) 123-128 available from: PM:16458071
- Welburn, S.C., Picozzi, K., Fevre, E.M., Coleman, P.G., Odiit, M., Carrington, M., & Maudlin, I. 2001. Identification of human-infective trypanosomes in animal reservoir of sleeping sickness in Uganda by means of serum-resistance-associated (SRA) gene. *Lancet*, 358, (9298) 2017-2019 available from: PM:11755607
- WHO 1998, *Control and Surveillance of African Trypanosomiasis* WHO Technical Report Series No. 881, Geneva.
- WHO 2006. Human African Trypanosomiasis (sleeping sickness):epidemiological update. *Weekly Epidemiological Record* (8) 69-80
- WHO 2010, *Human African trypanosomiasis: number of new cases drops to historically low level in 50 years.*

Wiley, M., Teygong, C., Phelps, E., Radke, J., & Blader, I.J. 2011. Serum response factor regulates immediate early host gene expression in *Toxoplasma gondii*-infected host cells. *PLoS.ONE.*, 6, (3) e18335 available from: PM:21479245

Williams, B., Kabbage, M., Kim, H.J., Britt, R., & Dickman, M.B. 2011. Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS.Pathog.*, 7, (6) e1002107 available from: PM:21738471

Woo, P.T.K. 1977. Salivarian trypanosomes producing disease in livestock outside of sub-Saharan Africa. In: *Kreier, J.P.(Ed.), Parasitic Protozoa.Academic Press, New York* 269-296

Xong, H.V., Vanhamme, L., Chamekh, M., Chimfwembe, C.E., Van Den, A.J., Pays, A., Van, M.N., Hamers, R., De, B.P., & Pays, E. 1998. A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell*, 95, (6) 839-846 available from: PM:9865701

Young, R., Taylor, J.E., Kurioka, A., Becker, M., Louis, E.J., & Rudenko, G. 2008. Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. b. brucei* and *T. equiperdum*. *BMC.Genomics*, 9, 385 available from: PM:18700033

Yun, O., Priotto, G., Tong, J., Flevaud, L., & Chappuis, F. 2010. NECT is next: implementing the new drug combination therapy for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, 4, (5) e720 available from: PM:20520803

Zoller, T., Fevre, E.M., Welburn, S.C., Odiit, M., & Coleman, P.G. 2008. Analysis of risk factors for *T. brucei rhodesiense* sleeping sickness within villages in south-east Uganda. *BMC.Infect Dis.*, 8, 88 available from: PM:18590541

CAPÍTULO I

Presencia de *Trypanosoma brucei gambiense* en el ganado peri-doméstico de los focos de Kogo y Mbini

Este capítulo reproduce íntegramente el siguiente manuscrito:

C. Cordon-Obras, P. Berzosa, N. Ndong-Mabale, L. Bobuakasi, J. N. Buatiche, P. Ndongo-Asumu, A. Benito and J. Cano. 2009 *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock of Kogo and Mbini foci (Equatorial Guinea). *Tropical Medicine and International Health*, vol 14, 5: 535-541.

Para investigar la posible implicación de la fauna peri-doméstica en el ciclo de transmisión de la enfermedad del sueño en los focos hipo-endémicos de Kogo y Mbini (Guinea Ecuatorial), se evaluó la infección de *Trypanosoma brucei gambiense* en el ganado local. Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específica para *T. b. gambiense* (grupo 1) y otros tripanosomas zoonóticos, se efectuó el diagnóstico de 698 animales domésticos (cabras, ovejas y cerdos) procedentes de las localidades endémicas de Kogo y Mbini. *Trypanosoma brucei* s.l. fue la especie más prevalente en ambos focos. Se detectó en 182 animales (52.6%) de Mbini y en 127 (36.1%) de Kogo. Sólo se encontró *T. b. gambiense* en 7 animales procedentes de Mbini y una única co-infección de este parásito con *T. vivax*. La presencia de *T. b. gambiense* en el ganado doméstico de Mbini y su ausencia en Kogo podría explicar las diferencias epidemiológicas observadas entre estos focos y tener implicaciones significativas en el control de la enfermedad del sueño en Guinea Ecuatorial.

***Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock of Kogo and Mbini foci (Equatorial Guinea)**

C. Cordon-Obras¹, P. Berzosa¹, N. Ndong-Mabale^{2,3}, L. Bobuakasi³, J. N. Buatiche³, P. Ndongo-Asumu², A. Benito¹ and J. Cano^{1,3}

¹ National Centre of Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain

² National Sleeping Sickness Control Programme, Ministry of Health and Social Welfare, Bata, Equatorial Guinea

³ National Centre of Endemic Control, Institute of Health Carlos III, Malabo, Equatorial Guinea

Summary

OBJECTIVE To evaluate *Trypanosoma brucei gambiense* infection in peri-domestic livestock from Kogo and Mbini foci (Equatorial Guinea) in order to investigate its possible implication in the sleeping sickness transmission cycle in these hypoendemic foci.

METHODS Samples from 698 domestic animals (goats, sheep and pigs) from trypanosomiasis-endemic localities of Kogo and Mbini foci were tested for animal trypanosomes and *T. b. gambiense* (group I) by species-specific polymerase chain reaction.

RESULTS *Trypanosoma brucei* s.l., the predominant trypanosome species, was detected in 182 (52.6%) samples from Mbini and in 127 (36.1%) samples from Kogo. *T. b. gambiense* was only identified in seven (2%) of the Mbini samples and one co-infection (with *T. vivax*) was observed.

CONCLUSION The occurrence of *T. b. gambiense* in peri-domestic livestock in Mbini and its absence in Kogo could explain the epidemiological differences between the two foci and could have significant implications for sleeping sickness control in Equatorial Guinea.

keywords human African trypanosomiasis, animal reservoir, *Trypanosoma brucei gambiense*, sleeping sickness, polymerase chain reaction

Introduction

Human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness is caused by two sub-species of *Trypanosoma brucei* s.l.; *T. brucei gambiense*, the etiologic agent of the chronic form of the disease in Western and Central Africa, and *T. brucei rhodensiense*, which produces an acute clinical manifestation in Eastern Africa (Hoare 1972).

Since 2001 a significant reduction of referred annual cases has been noted (17 500 per year) with an incidence estimated of 50 000–70 000 annual cases, due to the reactivation of the epidemiological surveillance and control activities in several African countries (WHO 2006). Despite this apparent control, the interruption of control campaigns can lead to the infection reemerging in epidemic outbreaks with high mortality rates (Louis *et al.* 2002; Courtin *et al.* 2008), a phenomenon which could be explained in part by the maintenance of infection in local fauna.

The role played by animals as reservoirs of *T. b. rhodensiense* is well documented (Enyaru *et al.* 2006;

Welburn *et al.* 2006) but disputed in the case of the *gambiense* form. Although *T. b. gambiense* occurs in domestic and wild fauna of Western and Central Africa (Gibson *et al.* 1978; Njiokou *et al.* 2006; Simo *et al.* 2006), the epidemiologic role within the transmission cycle needs to be established.

T. b. brucei, parasite of some non-human mammals, is morphologically identical to *T. b. gambiense* and *T. b. rhodensiense*, limiting parasitological differentiation in animal samples. Molecular methods, such as the polymerase chain reaction (PCR), are a more sensitive and specific option than the traditional parasitological techniques for the detection of animal trypanosomes. However, low parasitemia, characteristic of *T. b. gambiense* and *T. b. brucei* infections, frequently causes problems of reproducibility, regardless of the DNA extraction protocol (Solano *et al.* 2002). This fact has limited the design of molecular techniques and their standardisation for *T. b. gambiense* detection in animals.

Equatorial Guinea has four historical HAT foci (Simarro *et al.* 1988): Kogo, Mbini and Campo on the mainland and Luba, which is now considered free of HAT, on Bioko

CAPÍTULO II

***Trypanosoma brucei gambiense* en el ciclo epidemiológico de Luba, un foco sin casos endémicos desde 1995**

Este capítulo reproduce íntegramente el siguiente manuscrito:

C. Cordon-Obras, C. García-Estébanez, N. Ndong-Mabale, S. Abaga, P. Ndongo-Asumu, A. Benito and J. Cano. 2010. Screening of *Trypanosoma brucei gambiense* in Domestic Livestock and Tsetse Flies from an Insular Endemic Focus (Luba, Equatorial Guinea). PLoS Neglected Tropical Diseases 4(6): e704.

La enfermedad del sueño está presente en 36 países del África Subsahariana. En África Central y Occidental la enfermedad está causada por *Trypanosoma brucei gambiense*, que causa una manifestación clínica crónica. El foco de Luba (Isla de Bioko, Guinea Ecuatorial) no ha reportado casos autóctonos de enfermedad del sueño desde 1995 pero dada la complejidad del ciclo epidemiológico, la eliminación del parásito en el entorno global es difícil de asegurar de manera categórica. El objetivo de este trabajo es valorar utilizando diagnóstico molecular (reacción en cadena de la polimerasa –PCR–) la posible permanencia de *T. b. gambiense* en el vector (*Glossina* sp.) y la fauna doméstica con el objeto de mejorar nuestro entendimiento sobre la situación epidemiológica de la enfermedad en un foco aislado y considerado bajo control. Los resultados muestran la ausencia del parásito en la fauna local, pero su presencia, aunque a muy baja prevalencia, en el vector. Por otra parte, los datos entomológicos señalan una alta densidad de mosca tsetse en dos de las diez localidades consideradas en el foco. Nuestros resultados demuestran que incluso en condiciones de control aparente, la completa eliminación del parásito es difícil de conseguir. Futuras investigaciones deberían centrarse en los reservorios animales que pudieran estar permitiendo la persistencia de *T. b. gambiense* incluso en ausencia de casos humanos. En Luba, donde el ganado doméstico es menos numeroso que en otros focos del país, el significado epidemiológico de la fauna salvaje debería ser valorado para establecer su papel en el mantenimiento de la infección.

Screening of *Trypanosoma brucei gambiense* in Domestic Livestock and Tsetse Flies from an Insular Endemic Focus (Luba, Equatorial Guinea)

Carlos Cordon-Obras^{1*}, Carmen García-Estébanez¹, Nicolás Ndong-Mabale^{2,3}, Simón Abaga⁴, Pedro Ndong-Asumu³, Agustín Benito¹, Jorge Cano^{1,2}

1 National Centre of Tropical Medicine (Institute of Health Carlos III), Madrid, Spain, **2** Reference Centre for Endemic Diseases Control in Equatorial Guinea, Ministry of Health and Social Welfare, Malabo, Equatorial Guinea, **3** National Sleeping Sickness Control Programme, Ministry of Health and Social Welfare, Bata, Equatorial Guinea, **4** National Programme for Malaria Control, Ministry of Health and Social Welfare, Malabo, Equatorial Guinea

Abstract

Background: Sleeping sickness is spread over 36 Sub-Saharan African countries. In West and Central Africa, the disease is caused by *Trypanosoma brucei gambiense*, which produces a chronic clinical manifestation. The Luba focus (Bioko Island, Equatorial Guinea) has not reported autochthonous sleeping sickness cases since 1995, but given the complexity of the epidemiological cycle, the elimination of the parasite in the environment is difficult to categorically ensure.

Methodology/Principal Findings: The aim of this work is to assess, by a molecular approach (Polymerase Chain Reaction, PCR), the possible permanence of *T. b. gambiense* in the vector (*Glossina* spp.) and domestic fauna in order to improve our understanding of the epidemiological situation of the disease in an isolated focus considered to be under control. The results obtained show the absence of the parasite in peridomestic livestock but its presence, although at very low rate, in the vector. On the other hand, interesting entomological data highlight that an elevated concentration of tsetse flies was observed in two out of the ten villages considered to be in the focus.

Conclusions: These findings demonstrate that even in conditions of apparent control, a complete parasite clearance is difficult to achieve. Further investigations must be focused on animal reservoirs which could allow the parasites to persist without leading to human cases. In Luba, where domestic livestock are scarcer than other foci in mainland Equatorial Guinea, the epidemiological significance of wild fauna should be assessed to establish their role in the maintenance of the infection.

Citation: Cordon-Obras C, García-Estébanez C, Ndong-Mabale N, Abaga S, Ndong-Asumu P, et al. (2010) Screening of *Trypanosoma brucei gambiense* in Domestic Livestock and Tsetse Flies from an Insular Endemic Focus (Luba, Equatorial Guinea). PLoS Negl Trop Dis 4(6): e704. doi:10.1371/journal.pntd.0000704

Editor: Joseph Mathu Ndung'u, Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), Switzerland

Received: February 2, 2010; **Accepted:** April 15, 2010; **Published:** June 8, 2010

Copyright: © 2010 Cordon-Obras et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by the Spanish International Cooperation Agency for Development (AECID) and the Institute of Health Carlos III (Ministry of Science and Innovation) within the Network of Tropical Diseases Research Centers (RICET R06/0021/0000). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ccordon@isciii.es

Introduction

Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness, is a parasitic disease endemic of the African continent. HAT is caused by two subspecies of the flagellate *Trypanosoma brucei*; *T. b. gambiense*, spread over West and Central Africa, which is responsible for the chronic form of the disease (more than 90% of total number of cases) and *T. b. rhodesiense*, which is present in East Africa and produces a few cases of acute infection per year. In addition, other members of *Trypanosoma* genus are able to infect a wide variety of animals producing diseases of veterinary importance such as nagana (*T. b. brucei*, *T. vivax* and *T. congolense*), surra (*T. evansi*) or dourine (*T. equiperdum*). *T. brucei* s.l. is mainly transmitted by tsetse flies (Diptera, Glossinidae) but other trypanosomes can be mechanically or sexually transmitted [1,2].

In last years, control activities against sleeping sickness have been encouraged and significant advances were achieved to

eliminate the disease [3]. The main strategy was to actively screen the human carriers in endemic foci [4,5] since it is assumed that humans are the main reservoir of *T. b. gambiense* infection [6].

Luba focus, located on Bioko Island (Equatorial Guinea), is a good example of the success of control campaigns exclusively directed to humans. HAT was firstly declared in Luba in 1910 [7] and two decades later a successful control programme was implemented. At the end of 1960s, sleeping sickness was considered to be under control over the entire country and after the independence in 1968, HAT ceased to be a priority of public health for the new authority. In the middle of 1980s, Luba suffered a resurgence of the disease registering hundreds of cases leading to the establishment of the Sleeping Sickness National Control Programme (SSNCP) by Health Ministry and Social Welfare. This programme targeted the disease control combining active cases detection and passive surveillance using serological techniques. All parasitologically confirmed and serologically suspected cases were treated. This strategy led to a drastic reduction in the number of

Author Summary

Sleeping sickness is a neglected disease with an important impact on public health of many countries of Sub-Saharan Africa. It is transmitted by tsetse fly bites (the vector) and mainly affects remote and rural populations. The chronic form, caused by *Trypanosoma brucei gambiense*, includes almost 90% of reported cases, and it is often misdiagnosed or lately detected after months or years of infection. Many efforts have been carried out to control the disease and interesting advances have been achieved. Although elimination is considered possible, there is an urgent need to understand the disease dynamic, especially in foci with very low rate (or absent) of infection for a long time. We performed a parasite screening in tsetse flies and livestock from Luba focus (Equatorial Guinea), considered to be "controlled" since 1995 (no human cases for fifteen years). The obtained results demonstrate that *T. b. gambiense* still remains in the environment and entomological data reveal high population density of the vector in some localities. This finding suggests that other intervention ways focused on control of vector populations, combined with the detection of human cases, could be necessary to achieve the total elimination of the parasite in hypoendemic foci.

reported patients. The last autochthonous case was recorded in 1995 and no more surveys have been carried out since 2004 [5].

As occurred in Luba, the neglect of control activities in the past has led to a resurgence of HAT foci considered to have been eliminated. Several hypotheses could explain the resurgence of the disease in apparently controlled foci and the heterogeneity of the disease prevalence in neighbouring foci: movement of carrier populations from active foci [8], changes of the tsetse flies host preference [9,10], genetic variability of the parasite [11,12], the existence of asymptomatic parasite-infected individuals [13], inherent limitations of surveillance systems [14] and maintenance of infection in animal reservoirs. The latter theory is supported by the capability of the parasite for surviving in some species of domestic and wild animals [15–24].

This study aims to analyse *T. b. gambiense* infection in tsetse flies and domestic livestock from localities of Luba focus, in order to determine the presence of the parasites apart from the human transmission cycle. Species-specific molecular tools (PCR) were employed for diagnosis. In addition, entomological data about tsetse fly populations in these localities are provided and discussed.

Materials and Methods

Study Area

Luba focus covers a surface of 700 Km² in south-western of Bioko Island. There are two climatic seasons: the dry season, from December to May, and the rainy season, from June to November. Bioko's annual rainfall exceeds 2,000 mm and the relative humidity ranges from 70% to 100% throughout the year. The average temperature is 25°C, with the minimum ranging from 17°C to 21°C and the maximum from 29°C to 30°C, depending on the location and the season [25].

The majority of the inhabitants from Luba lived on smallholding, hunting and sea fishing. Rainforest and neglected cocoa plantations are widespread in Luba district, establishing suitable habitats for the tsetse flies [26,27]. Nowadays, many people from rural areas have migrated to urban, mainly to the capital city (Malabo), due to the recent development of petroleum and building industry. Therefore, rural conditions have partially

disappeared and, as a result, many risk factors have been removed. Nevertheless, some villages remain unchanged and human-vector contact is still common.

Sample Collection

In September 2007, blood samples of domestic animals (pigs, sheep and goats) were collected and tsetse flies were captured for further molecular analysis. Sampling procedures on Whatman filter paper for animal blood have been described elsewhere [28]. A previous census of livestock was elaborated in order to ensure a significant sample size. Ethical approval was obtained by Ministry of Health and Social Welfare and Veterinary Service from continental region (Ministry of Agriculture, Forestry and Environment). The study was conducted adhering to these institutions' guidelines for animal husbandry. Verbal informed consent was obtained from each owner of livestock prior to the extraction of blood samples by the field team.

Monopyramidal traps were employed to catch tsetse flies [29]. This kind of trap has been successfully applied for vector control and entomological surveillance in Equatorial Guinea [26,30,31]. This device makes flies to fall in a collecting bottle containing conservation solution (formaldehyde 5%) and to be stored until the gathering. Fifty-five traps were spread over the 10 villages belonging to epicentre of Luba focus. They were located in places considered *a priori* as suitable habitats for tsetse flies. This criterion includes water sources, cocoa or coffee plantations and shady and humid ponds close to livestock [32–34]. Geographical coordinates of all traps were registered by GPS (Figure 1) and they remained two weeks in the field. Sampling was carried out twice, a week after the placing and when the traps were removed.

Tsetse flies collected were stored in tubes with absolute ethanol in the field and separately processed in laboratory recording the trap number, an individual code, village, date, species, sex and age. The key of Brunhes *et al.* [35] was used for species identification and an age estimator, based on the degree of wear or fraying observed on the hind margin of the wing, was employed as previously described [36,37]. In addition, apparent density (AD), estimated as AD = number of tsetse flies/trap/day, was calculated for each trap.

Both tsetse flies and blood samples were sent to National Centre of Tropical Medicine, Institute of Health Carlos III (Spain) for molecular processing.

DNA Extraction and Molecular Analysis

DNA extraction from blood samples was performed employing a slightly modified protocol with Chelex 100® ionic resin (Bio-Rad Laboratories, Madrid, Spain) as previously described [28,38].

Prior to DNA extraction, wings and legs of tsetse flies were removed using a sterile surgical blade. This step was carried out in order to minimize the amount of exoskeleton compounds included in the sample, which are known to inhibit subsequent enzymatic reactions [39]. Flies were then washed in 70% ethanol and in double distilled water (DDW). For dried samples, each fly was put in a sterile 1.5 ml tube and DNA extraction was performed employing the SpeedTools Tissue DNA Kit (Biotools, B & M Labs, S.A., Madrid, Spain) following the manufacturer instructions. All extraction instruments were sterilized after processing each fly by ethanol submersion and flaming. Finally, a negative control (clean 1.5 ml tube with no sample) was included in all procedures of the extraction (one negative each seventeen samples).

Ten µl of DNA template from blood samples were subjected to species-specific PCR for *T. brucei* s.l. and, when positive, for *T. b. gambiense*. For *T. brucei* s.l. analysis, TBR1/2 primers were used

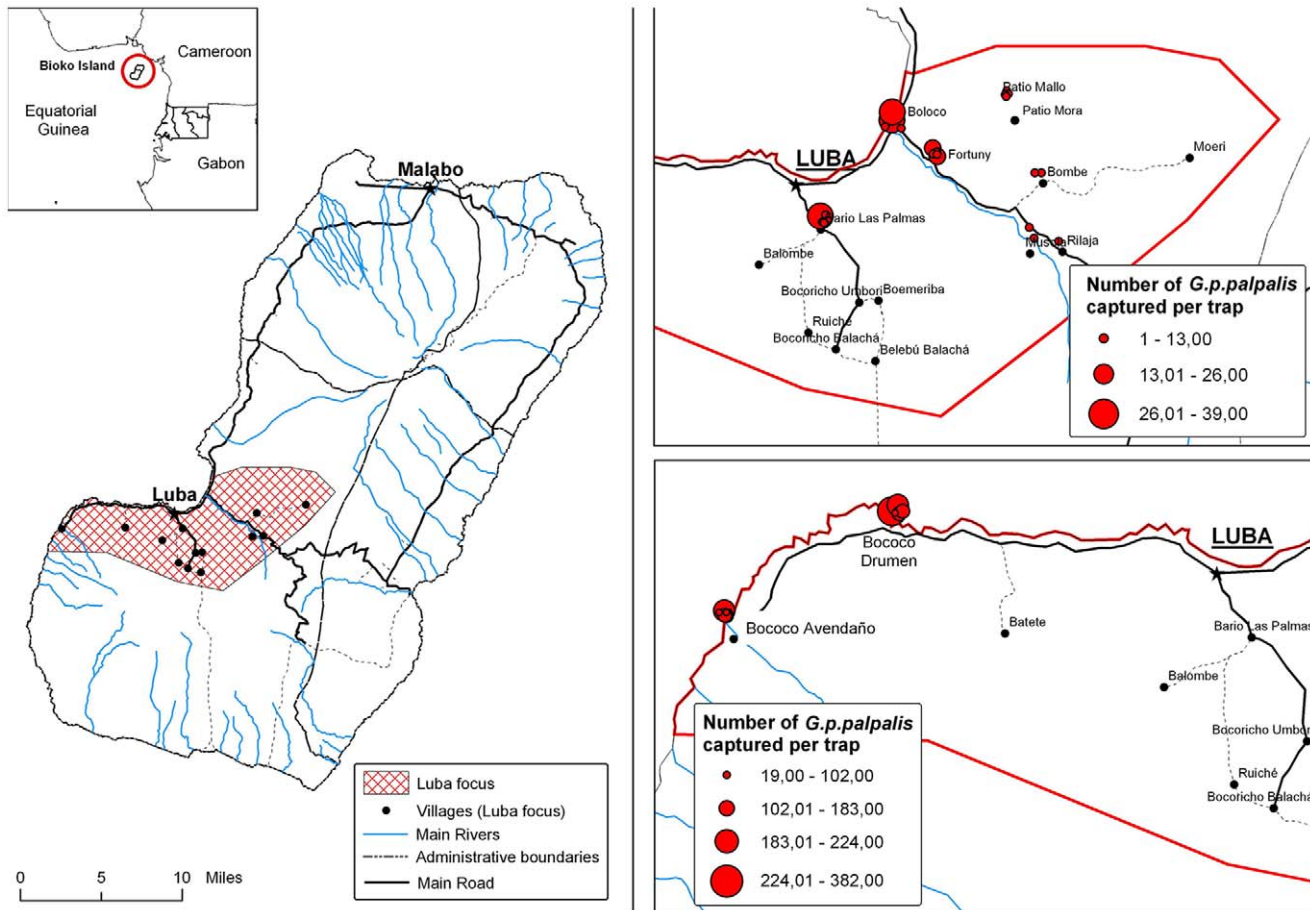


Figure 1. Map of Luba focus and distribution of tsetse fly captures over the villages.
doi:10.1371/journal.pntd.0000704.g001

[40] with the following conditions: 1× PCR Reaction Buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3), 200 μM of each deoxynucleotide (dNTP), primers at 0.5 μM and 1.25 U of *Taq* DNA Polymerase (Roche Diagnostics, S.L. Barcelona, Spain) in a final volume of 50 μl. Positive samples for this test were diagnosed for *T. b. gambiense* employing a nested-PCR with a first reaction using TgsGP1/2 primers [41] and a second one with TgsGP sense2/antisense2 primers described by Morrison *et al.* [42]. In both reactions 50 μl of final volume were reached and conditions were identical to *T. brucei* s.l. test with the exception of the amount of polymerase employed (2.5 U). The amplification programme for *T. brucei* s.l. was set as follows: a first step at 85°C (5 min) for hot starting, 3 min at 95°C for initial DNA denaturation, 40 cycles of 95°C (1 min), 55°C (1 min) and 72°C (1 min) and a final extension step at 72°C (5 min). For the first reaction of *T. b. gambiense* the fixed programme was: initial denaturation step at 95°C (5 min), 45 cycles of 94°C (1 min), 63°C (1 min) and 72°C (1 min) with a final extension step at 72°C for 5 min. The programme for the second reaction was identical but only 25 cycles were performed.

The quality of DNA templates from tsetse samples were tested by amplification of specific tubulin gene following the protocols described by Hao Z *et al.* (2003) [43] and Ferreira F *et al.* (2008) [44]. This step was considered because of the known PCR inhibition with samples of arthropods [39]. DNA samples that displayed a positive amplification signal for the tsetse tubulin gene were further tested to detect *T. brucei* s.l. and *T. b. gambiense* with

the same primers and similar conditions as above: 1× PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 2 mM MgCl₂, primers at 0.5 μM, 200 μM of each dNTP, 1 μl of DNA template and 1 U of AmpliTaq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA) reaching a final volume of 25 μl. The amplification programmes were modified increasing the time for the first denaturation step up to 10 minutes for polymerase activation as recommended by manufacturer and excluding the manual hot start step performed previously for *T. brucei* s.l. reactions.

In all PCR assays two negative controls (with DDW as template) and one positive control (1 ng DNA from *T. brucei* s.l. 328.114 or 1 ng from *T. b. gambiense* ELIANE) were included.

All amplification products were separated by electrophoresis in a 2% agarose gel stained with ethidium bromide (1 μg/ml) and photographed under UV light. Any sample displaying a visible band of the expected length in the gel was considered as positive (Figure 2).

Statistical Analysis

SPSS software (version 16.0.1, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was employed for statistical analysis and randomization of samples. Chi-square analysis was applied in order to compare significance of differences between variables (CI 95%). Given the low number of animals sampled in each village and subsequently positives for *T. brucei* s.l., no variables were statistically compared. Regarding tsetse flies, statistical associations between sex, age,

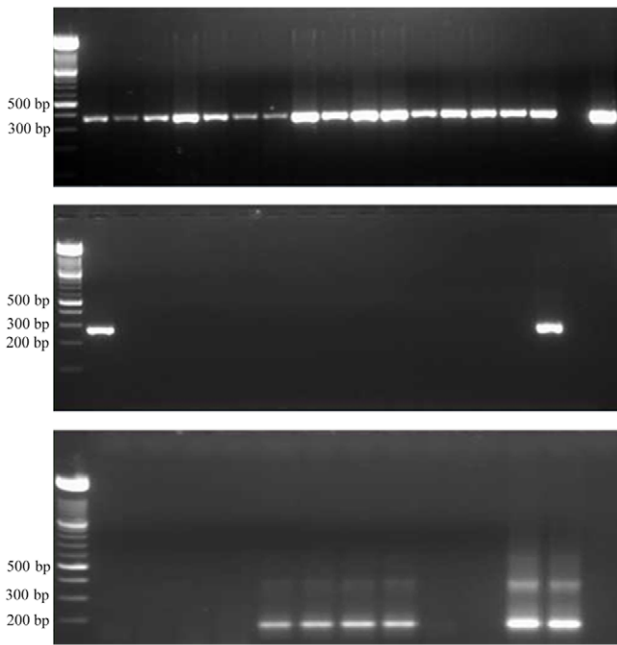


Figure 2. Revealed results of PCR in 2% agarose gel stained with ethidium bromide under UV. Above: Samples from sixteen tsetse flies submitted to PCR using GmTub primers as DNA quality control. Expected band size ~380 bp. Middle: Molecular diagnosis of samples from fifteen tsetse flies for *T. b. gambiense*. First sample corresponds to the one positive tsetse fly. The band at right is the positive control. Expected band size 270 bp. Below: Detection of *T. brucei* s.l. in animal samples. 5–8 and 11 are positives, 12 is the positive control. Expected band size 177 bp.
doi:10.1371/journal.pntd.0000704.g002

sampling week, village and *T. brucei* infection were analysed, considering statistically significant p-value<0.05.

Results

Entomological Field Data

Overall 1,839 flies were collected. Almost all of them (1,830) were identified as *G. palpalis palpalis* as expected by previous

entomological data in the country [5,30,31]. Eight flies were registered as *Glossina caliginea* and one individual could not be classified. Only two villages (Bococo Drumen and Bococo Avendaño) concentrated 89.7% of overall captures (1,650/1,839) (Table 1) and those localities showed a mean AD higher than 1 (14.9 in B. Drumen and 8.7 in B. Avendaño). The overall sex ratio was 1.59 (1,128 females/711 males) and no significant difference was observed between the sampling weeks ($\chi^2 = 0.005$, $p = 0.942$). However, sex ratio varies among the villages, from 1.01 in the lowest sampling localities to 1.33 in B. Avendaño and 2.2 in B. Drumen ($\chi^2 = 19.2$, $p < 0.001$). Distribution of flies by age groups shows that during second sampling week collected individuals were significantly younger than in the first one ($\chi^2 = 62.16$, $p < 0.001$).

Molecular Analysis

A total of 951 tsetse flies gathered (761 randomly selected from B. Drumen and B. Avendaño and 190 flies collected from the other villages) were submitted to DNA extraction and specific tubulin amplification. From them, 905 (95.2%) yielded a positive result for tubulin amplification and then were considered to have enough DNA quality to be included in further diagnostic analysis. Overall, 28.6% (259) of these flies were positive for specific *T. brucei* s.l. PCR and only one (a young male fly from Bococo Drumen) showed a positive amplification for TgsGP being considered as carrier of *T. b. gambiense*. No significant difference in *T. brucei* s.l. prevalence was observed regarding the sex ($\chi^2 = 0.708$, $p = 0.401$), age ($\chi^2 = 9.368$, $p = 0.095$) or week of sampling ($\chi^2 = 0.000$, $p = 1.00$) but infection rate was significantly higher in B. Drumen than the others localities ($\chi^2 = 42.43$, $p < 0.001$). Among the *G. caliginea* individuals (6) included in the analysis neither *T. brucei* s.l. nor *T. b. gambiense* were detected.

A previous census showed that there were 161 animals in villages belonging to the epicentre of Luba focus. Only 84 (52.2%) could be sampled since livestock were not kept in sheds and moved freely around the dwellings. Nine animals (eight pigs and one goat) (10.7%) yielded a positive result for *T. brucei* s.l. and none of them resulted positive for *T. b. gambiense* (Table 2).

Discussion

In order to investigate the presence of *Trypanosoma brucei gambiense* in Luba focus and its possible maintenance in a non-

Table 1. Distribution of tsetse fly captures and infection amongst villages.

Village	Total Captures 1 st week	Total Captures 2 nd week	Positives for <i>T. brucei</i> s.l./Total analysed	Positives for <i>T. b. gambiense</i>	AD*
B. Las Palmas	27	20	9/47	0/9	0.67
Fortuny (Boloco)**	57	27	20/81	0/20	0.88
Fortuny	22	17	7/38	0/7	
Musola	1	2	1/3	0/1	0.04
Rilaja	0	1	1/1	0/1	0.01
Bombe	1	1	1/2	0/1	0.03
Patio Mallo	9	5	3/12	0/3	0.2
B. Drumen	550	493	143/531	1/143	14.9
B. Avendaño	270	336	74/190	0/74	8.67
Total	937	902	259/905	1/259	2.39

No flies were trapped in Moeri or Patio Mora.

*AD = Apparent density calculated as number of flies/trap/day.

**Boloco belongs to Fortuny village but a set of five traps were located there due to its relative geographical distance.

doi:10.1371/journal.pntd.0000704.t001

Table 2. Distribution of animal sampling and infection amongst villages.

Village	Number of animals sampled/censed			Number of animals positive for <i>T. brucei</i> s.l.		
	Pigs	Goats	Total	Pigs	Goats	Total
B. Las Palmas	7/11	10/15	17/26	0/7	0/10	0/17
Fortuny (Boloco)	7/36	4/7	11/43	0/7	0/4	0/11
Fortuny	0/0	3/3	3/6	0/0	0/3	0/3
Patio Mallo	9/14	0/0	9/14	1/9	0/0	1/9
B. Drumen	24/40	4/4	28/44	4/24	1/4	5/28
B. Avendaño	16/28	0/0	16/28	3/16	0/0	3/16
Total	63/129	21/29	84/161	8/63	1/21	9/84

Although three sheep were censed none of them could be sampled. In Musola, Rilaja, Bombe, Moeri and Patio Mora, no animals were present.
doi:10.1371/journal.pntd.0000704.t002

human transmission cycle, molecular diagnosis was performed on tsetse flies and peridomestic fauna. Our study has revealed the occurrence of one tsetse fly carrier of *T. b. gambiense*, demonstrating that parasite has not completely disappeared from the environment. Although only one individual was considered positive (prevalence ~0.1%) this result is consistent with the typical low infection rate reached in the vector even in active foci [45,46]. Regarding the domestic livestock no *T. b. gambiense* was detected, contrary to occur in other continental foci [28].

Prevalence of *T. brucei* s.l. was also determined in order to obtain an estimation of transmission activity in the focus. In tsetse flies, an overall high rate of infection was shown, although variations were observed regarding the village. A significantly higher tsetse flies infection rate was observed in Bococo Drumen from where it was gathered the majority of specimens collected in the focus during the study. In contrast, a relatively low prevalence of *T. brucei* s.l. in livestock was noticed, especially when compared with those previously described in continental foci [28]. Taking both data together it could be suggested that there is a high transmission activity, mainly in Bococo Drumen, but domestic fauna do not seem to act as the main feeding source for *G. p. palpalis* populations as in the other mainland foci.

A wild transmission cycle could explain all these epidemiological features: *G. p. palpalis* would mainly feed over wild fauna, which could lead to a high trypanosome infection rate of the vector and the maintenance of *T. b. gambiense* in the focus. Wild fauna would have a role as reservoir of *T. b. gambiense*, absent in peridomestic cycle, and it would be expected to show a higher prevalence for *T. brucei* s.l. than observed in livestock. In contrast with this situation, in Mbini focus (mainland Equatorial Guinea) domestic animals (sheeps and goats) have shown to be carriers of *T. b. gambiense* [28]. It should be pointed out that livestock breeding is more common in continental foci, where almost all villages have some kind of farming. In Mbini, around five hundred animals were censed in a previous study [28], whereas Luba only registered 161. A less availability of livestock could be other factor which favours the feeding preference of *G. p. palpalis* for wild fauna. Tsetse fly host preferences should be thoroughly studied in order to clarify this issue but the opportunistic feeding behaviour of this species described in several studies allows to hypothesize about a wild transmission cycle [47,48]. Also, further research should be carried out in Luba to determine the role of wild animals in the maintenance of *T. b. gambiense* which has been previously described and discussed in neighbouring countries [15–17,20,22–24].

Some points about data must be added to this discussion. Firstly, the relative low sensitivity of the diagnostic technique employed

for *T. b. gambiense* detection was previously reported since it targets TgsGP gene, only present once per haploid genome [49]. The low sensitivity of the test should not be *a priori* a serious drawback for tsetse flies samples since a great number of *Trypanozoon* subgenus parasites are usually found in infected midgut (around a maximum of 10^6) [50] but it should be taken into account when data from animal blood samples are analysed. On the other hand, not all domestic animals were sampled and, as a result, it cannot be categorically ruled out the presence of the parasite in these hosts. These considerations should lead to weigh up the alternative hypothesis of the maintenance of infection in domestic livestock even in the absent of positive samples. In favour of this theory, it is noteworthy that Bococo Drumen and Bococo Avendaño, the villages where the tsetse fly density was higher, show the majority of domestic animals too. However, the low *T. brucei* s.l. infection rate found in livestock contradicts this apparent correlation. Future studies narrowly focused in feeding preferences of tsetse flies in Luba could clarify this issue.

Entomological data were also gathered in order to better understand the epidemiological dynamic of the focus. Surprisingly, it was shown that only two out of ten villages sampled in the epicentre of Luba exhibited a high density of vector population. Almost 90% of collected flies belonged to B. Drumen and B. Avendaño. These villages registered a significantly higher AD levels than the others which showed AD values according to the data observed in mainland foci [30,31]. Factors such as rural condition, a more isolated location, a suitable environmental for resting and breeding (cocoa and coffee plantations) and the absence of vector control activities may have contributed to the spreading of tsetse fly populations in these villages. Moreover, the presence of wild and domestic animal hosts in this remote area of the southern Luba district could be the most conditioning factor in the vector densities. A higher sex ratio (female/male) of tsetse flies was also noticed in B. Drumen and B. Avendaño while this rate was near 50% in the other villages sampled. In previous studies carried out in mainland foci, a seasonal variation of sex ratio was observed, being higher after a peak of *G. p. palpalis* density typically reached at the end of rainy seasons [30,31]. The sampling of this study was carried out during that period in order to collect as many flies as possible for a more accurate analysis and then, a high female/male ratio was expected. This pattern is more noticeable in the two villages with a higher density of vector where population seems to be well established and follow the natural dynamic. On the other hand, the individuals caught in the second week were younger, suggesting that the removal of flies during the first week had an impact over population dynamic. This phenomenon was

also noticed in previous studies in this focus [26,27]. It is consistent with the known low reproductive rate of *Glossina* genus and its relatively small population sizes [34,51,52].

Vector control was performed in Luba during a few months in order to assess its utility for reducing the human – vector contact. It was later given up and control activities were focused in active screening of human cases and passive detection in the district hospital [5,27]. The high cost and maintained efforts needed for vector control strategies make it unsuitable in conditions of very low human infection rate. Nevertheless, strategies such as active screening, chemoprophylaxis with drugs, treatment of infection or spraying animals with insecticides to prevent bites of tsetse flies would not be viable in a wild cycle and hence, vector control would be the only option for an indirect intervention at this level. A vector control campaign focused in the areas surrounding villages with higher density of tsetse fly could reduce the vector - fauna contact, enabling a permanent elimination of the parasite in the epidemiological cycle.

In the last two decades, successful control campaigns have been carried out in Luba. Its insular situation gives a degree of isolation which makes more difficult the reintroduction of new cases or infected vectors from neighbouring countries, condition which allowed the tsetse fly elimination in others islands such as Zanzibar and Principe [53–55]. Other foci in the mainland Equatorial Guinea, where the same control activities were undertaken, have showed a fall of reported patients but *T. b. gambiense* infection was never completely cleared and a constant drop of cases per year is currently being described [3]. Other factors, such as economical changes (mainly petroleum exploitation) and the subsequent abandon of rural activities such livestock breeding and agriculture, could have contributed to the exceptional success of these control campaigns in Luba.

The results of this study suggest interesting features about trypanosomiasis epidemiology in Luba focus. Several differences have been noticed with regards to the other foci of Equatorial

Guinea. *T. brucei* s.l. prevalence in domestic animals is much lower in Luba and no positive *T. b. gambiense* samples were found. By contrast, *T. brucei* s.l. infection rate in tsetse flies was high which could be a signal of an intense transmission. Taking into account both data, the hypothesis of the wild fauna as an important feeding source of *Glossina* spp. and *T. brucei* s.l. reservoir should be considered. Although the prevalence rate is very low, *T. b. gambiense* infection in tsetse fly also confirms the theory of the permanence of this parasite in Luba focus. It could be concluded that controlling HAT in a given focus is a complex aim and different approaches must be addressed; conventional active human screening is an efficient strategy to decrease the number of cases but other interventions (such as vectorial control and management of other reservoirs) could be assessed in order to ensure the elimination of the parasite.

In the past, Luba suffered the effects of the neglect of successful control activities leading to a resurgence beginning the 1980s after more than 20 years of apparent absence of the parasite [26]. Nowadays, with the improved epidemiological knowledge achieved by decades of experience fighting the sleeping sickness, resurgences of this disease could be avoidable.

Acknowledgments

We would like to thank the National Sleeping Sickness Control Programme, Ministry of Health and Social Welfare of the Republic of Equatorial Guinea, for its technical support during the study. We are particularly grateful to Dr. P. Anda and M. Rodríguez Vargas for technical advices and Dr. J. M. Bart for his helpful revision of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CCO PNA AB JC. Performed the experiments: CCO CGE NNM SA. Analyzed the data: CCO CGE JC. Contributed reagents/materials/analysis tools: NNM SA PNA AB JC. Wrote the paper: CCO JC.

References

- Hoare CA (1972) The trypanosomes of mammals. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 749 p.
- Gibson W (2007) Resolution of the species problem in African trypanosomes. *Int J Parasitol* 37: 829–38.
- WHO (2006) Human African Trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update. *Weekly Epidemiological Record*. pp 69–80.
- Lutumba P, Robays J, Miaka mia BC, Mesu VK, Molisho D, et al. (2005) Trypanosomiasis control, Democratic Republic of Congo, 1993–2003. *Emerg Infect Dis* 11: 1382–8.
- Simarro PP, Franco JR, Ndongo P, Nguema E, Louis FJ, et al. (2006) The elimination of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Trop Med Int Health* 11: 636–46.
- WHO (1998) Control and Surveillance of African Trypanosomiasis. WHO Technical Report Series No. 881, Geneva.
- Pittaluga G (1910) [Report of the Mission of the Instituto Nacional de Higiene Alfonso XIII sent to Spanish territories in the Gulf of Guinea to study Sleeping Sickness]. Imprenta artistica J. Bass y Cia, Madrid.
- Courtin F, Jamonneau V, Duvallet G, Garcia A, Coulibaly B, et al. (2008) Sleeping sickness in West Africa (1906–2006): changes in spatial repartition and lessons from the past. *Trop Med Int Health* 13: 334–44.
- Laveissiere C, Courret D, Staak C, Hervouet JP (1985) *Glossina palpalis palpalis* et ses hôtes en secteur forestier de Côte d'Ivoire. Relation avec l'épidémiologie de la tripanosomiase humaine. *Cah ORSTOM, Sér Ent Med Parasitol* 23: 297–303.
- Simo G, Mbida Mbida JA, Herder S, Njitchouang GR, Njiokou F (2005) Feeding preferences of Tsetse flies from human african trypanosomiasis foci of southern Cameroon. 28th Meeting ISCTRC Addis Ababa, Ethiopia.
- Simo G, Cuny G, Demonchy R, Herder S (2008) *Trypanosoma brucei gambiense*. Study of population genetic structure of Central African stocks using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Exp Parasitol* 118: 172–80.
- Truc P, Ravel S, Jamonneau V, N'Guessan P, Cuny G (2002) Genetic variability within *Trypanosoma brucei gambiense*: evidence for the circulation of different genotypes in human African trypanosomiasis patients in Cote d'Ivoire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 52–5.
- Koffi M, Solano P, Denizot M, Courtin D, Garcia A, et al. (2006) Aparasitemic serological suspects in *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis: a potential human reservoir of parasites? *Acta Trop* 98: 183–8.
- Louis FJ, Kohagne TL, Ebo'O EV, Simarro PP (2008) [Organizing an active screening campaign for human african trypanosomiasis due to *Trypanosoma brucei gambiense*]. *Med Trop (Mars)* 68: 11–6.
- Herder S, Simo G, Nkinin S, Njiokou F (2002) Identification of trypanosomes in wild animals from southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR). *Parasite* 9: 345–9.
- Njiokou F, Laveissiere C, Simo G, Nkinin S, Grebaut P, et al. (2006) Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infect Genet Evol* 6: 147–53.
- Njiokou F, Simo G, Nkinin SW, Laveissiere C, Herder S (2004) Infection rate of *Trypanosoma brucei* s.l., *T. vivax*, *T. congolense* “forest type”, and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroon. *Acta Trop* 92: 139–46.
- Njiokou F, Sima FO, Njitchouang GR, Nimpaye H, Cuny G, et al. (2005) Importance of domestic animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. 28th Meeting ISCTRC Addis Ababa, Ethiopia.
- Simo G, Asonganyi T, Nkinin SW, Njiokou F, Herder S (2006) High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. *Vet Parasitol* 139: 57–66.
- Guedegbe B, Verhulst A, Van MN, Pandey VS, Doko A (1992) [Serological evidence of the existence of a wild reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Pendjari biosphere reservation in the Republic of Benin]. *Ann Soc Belg Med Trop* 72: 113–20.
- Jamonneau V, Ravel S, Koffi M, Kaba D, Zeze DG, et al. (2004) Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Cote d'Ivoire. *Parasitology* 129: 693–702.
- Makumyaviri A, Mehlitz D, Kageruka P, Kazyumba GL, Molisho D (1989) [Animal reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in Zaire: trypanosome infections in two foci in Bas-Zaire]. *Trop Med Parasitol* 40: 258–62.
- Mehlitz D (1986) Le reservoir Animal de la Maladie du Sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*. Etudes et Synthèses de L'I E M V T.

24. Noireau F, Paindavoine P, Lemesre JL, Toudic A, Pays E, et al. (1989) The epidemiological importance of the animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in the Congo. 2. Characterization of the *Trypanosoma brucei* complex. *Trop Med Parasitol* 40: 9–11.
25. Alvar J, Mas-Coma S, Carrasco M (1996) Modern history and physical geography of Equatorial Guinea. *Res Rev Parasitol* 2–3: 77–83.
26. Simarro PP, Mas J, Lancien J, Ona SF, Mateo MJ, et al. (1990) [Epidemiology of human trypanosomiasis in the Luba focus, in Equatorial Guinea]. *Rev Sanid Hig Publica (Madr)* 64: 517–34.
27. Simarro PP, Sima FO, Mir M, Mateo MJ, Roche J (1991) [Control of human African trypanosomiasis in Luba in equatorial Guinea: evaluation of three methods]. *Bull World Health Organ* 69: 451–7.
28. Cordon-Obras C, Berzosa P, Ndong-Mabale N, Bobuakasi L, Buatiche JN, et al. (2009) *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock of Kogo and Mbini foci (Equatorial Guinea). *Trop Med Int Health* 14: 535–41.
29. Gouteux JP, Lancien J (1986) [The pyramidal trap for collecting and controlling tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Comparative trials and description of new collecting techniques]. *Trop Med Parasitol* 37: 61–6.
30. Cano J, Descalzo MA, Ndong-Mabale N, Ndong-Asumu P, Bobuakasi L, et al. (2007) Spatial and temporal variability of the *Glossina palpalis palpalis* (Diptera) population in the Mbini focus (Equatorial Guinea). *Int J Health Geogr* 6.
31. Cano J, Descalzo MA, Ndong-Mabale N, Ndong-Asumu P, Bobuakasi L, et al. (2007) Predicted distribution and movement of *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Glossinidae) in the wet and dry seasons in the Kogo trypanosomiasis focus (Equatorial Guinea). *J Vector Ecol* 32: 218–25.
32. Sane B, Laveissiere C, Meda HA (2000) [Diversity of feeding behavior of *Glossina palpalis palpalis* in the forest belt of the Ivory Coast: relation to the prevalence of human African trypanosomiasis]. *Trop Med Int Health* 5: 73–8.
33. Spath J (2000) Feeding patterns of three sympatric tsetse species (*Glossina* spp.) (Diptera: Glossinidae) in the preforest zone of Cote d'Ivoire. *Acta Trop* 75: 109–18.
34. Kuzoc FAS, Schofield CJ (2004) Strategic review of traps and targets for tsetse and African Trypanosomiasis control. Report of Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR) TDR/IDE/TRY/05.1.
35. Brunhes J, Cuisance D, Geoffroy B, Hervy JP, Lebbe J (1998) Les glossines ou mouches tsé-tsé. Logiciel d'identification. Glossine Expert. Manuel illustré d'utilisation. VI, ORSTOM, Paris: Université Paris.
36. Jackson CN (1946) An artificially isolated generation of tsetse flies (Diptera). *Bull Entomol Res* 37: 291.
37. Laveissiere C, Penchenier L (2000) Manuel de lutte contre la maladie du sommeil en Afrique centrale & occidentale. Ed OCEAC (IRD) Vol 5 Lutte Antivectorielle, Yaoundé, Cameroun.
38. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506–13.
39. Ravel S, Mariani C, Grebaut P, Jamonneau V, Cuisance D, et al. (2004) Inhibition of the DNA amplification of trypanosomes present in tsetse flies midguts: implications for the identification of trypanosome species in wild tsetse flies. *Parasite* 11: 107–9.
40. Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Bailey CP, McKane MR, et al. (1989) Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* 99 Pt 1: 57–66.
41. Radwanska M, Claes F, Magez S, Magnus E, Perez-Morga D, et al. (2002) Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am J Trop Med Hyg* 67: 289–95.
42. Morrison LJ, Tait A, McCormack G, Sweeney L, Black A, et al. (2008) *Trypanosoma brucei gambiense* Type 1 populations from human patients are clonal and display geographical genetic differentiation. *Infect Genet Evol* 8: 847–54.
43. Hao Z, Kasumba I, Aksoy S (2003) Proventriculus (cardia) plays a crucial role in immunity in tsetse fly (Diptera: Glossinidae). *Insect Biochem Mol Biol* 33: 1155–64.
44. Ferreira F, Cano J, Furtado A, Ndong-Mabale N, Ndong-Asumu P, et al. (2008) An alternative approach to detect *Trypanosoma* in *Glossina* (Diptera, Glossinidae) without dissection. *J Infect Developing Countries* 1: 63–7.
45. Jordan AM (1974) Recent developments in the ecology and methods of control of tsetse flies (*Glossina* spp.) (Diptera, Glossinidae). *Bull Entomol Res*. pp 361–99.
46. Dagnogo M, Traore G, Souleymane F (2004) Determination of sleeping sickness transmission risk areas from trypanosome infection rates of tsetse flies in Daloa, Côte. d'Ivoire. *Int J Trop Insect Sci*. pp 170–6.
47. Clausen PH, Adeyemi I, Bauer B, Breloer M, Salchow F, et al. (1998) Host preferences of tsetse (Diptera: Glossinidae) based on bloodmeal identifications. *Med Vet Entomol* 12: 169–80.
48. Simo G, Njiokou F, Mbida Mbida JA, Njitchouang GR, Herder S, et al. (2008) Tsetse fly host preference from sleeping sickness foci in Cameroon: epidemiological implications. *Infect Genet Evol* 8: 34–9.
49. Berberof M, Perez-Morga D, Pays E (2001) A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol Biochem Parasitol* 113: 127–38.
50. Gibson W (2009) Species-specific probes for the identification of the African tsetse-transmitted trypanosomes. *Parasitology*. pp 1–7.
51. Rogers D (1979) Tsetse population dynamics and distribution: a new analytical approach. *J Anim Ecol* 48: 825–49.
52. Hargrove J (1988) Tsetse: the limits to population growth. *Med Vet Entomol* 2: 203–17.
53. Vreysen MJ, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu ZR, et al. (2000) *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J Econ Entomol* 93: 123–35.
54. Da Costa B (1916) Sleeping sickness, a record of four years war against it in Principe, Portuguese West Africa. London: Ballière, Tindall and Cox editors. 300 p.
55. De Raadt P (1999) The history of sleeping sickness. In: Gilles HM, ed. Protozoal diseases. London: Arnold.

CAPÍTULO III

Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la adaptación de *Trypanosoma brucei gambiense* a diferentes hospedadores

Este capítulo reproduce íntegramente el siguiente manuscrito:

C. Cordon-Obras, J. Cano, D. González-Pacanowska, A. Benito, M. Navarro and J. M. Bart 2013. *Trypanosoma brucei gambiense* Adaptation to Different Mammalian Sera is Associated with VSG Expression Site Plasticity. PLoS Pathogens (en proceso de revisión)

La infección por *Trypanosoma brucei gambiense* es considerada como una antroponosis a pesar de que el parásito ha sido encontrado en animales domésticos y salvajes. Por lo tanto, la fauna podría estar actuando como reservorio, impidiendo la completa eliminación de la enfermedad en focos hipo-endémicos. Para comprender mejor el posible mantenimiento de *T. b. gambiense* en la fauna local e investigar los mecanismos moleculares implicados en su adaptación, se generaron líneas celulares adaptadas (LCAs) cultivando estos parásitos con suero de diferentes especies de mamíferos. *T. b. gambiense* fue capaz de establecerse con éxito en todos los sueros testados. Empleando anticuerpos específicos frente a la proteína variable de superficie (VSG) se descubrió que las LCAs mantenidas en suero humano, porcino y caprino variaron su VSG durante el proceso de adaptación. Aunque las nuevas VSGs expresadas fueron independientes del tipo de suero usado, el consistente cambio a diferentes VSG sugirió un remodelamiento en los genes co-transcritos en los sitios de expresión (BESs). El siguiente paso fue analizar algunos genes asociados a sitios de expresión (ESAGs) para investigar posibles polimorfismos en sus secuencias. Se identificaron los genotipos expresados de los ESAGs 6 y 7, que codifican el receptor de la transferrina, y el ESAG3 de las diferentes LCAs. Adicionalmente, los niveles de expresión de mRNA de ESAG6/7 y de incorporación de transferrina fueron medidos. Sorprendentemente, las LCAs de suero humano y porcino mostraron una selección específica de genotipo de

ESAG7 y una mayor incorporación de la transferrina respecto a las LCAs de suero bovino y caprino. Por el contrario, la adaptación en suero de cabra provocó una mayor diversidad genotípica y mayores niveles de expresión de ESAG6/7, aunque su incorporación de la transferrina fue un 40% menor que la de las LCAs de suero humano y porcino. Las LCAs de suero porcino mostraron unos parámetros de adaptación similares a las LCAs de suero humano, pero diferentes a los de los parásitos adaptados a suero caprino y bovino. La selección de diferentes VSGs y ESAGs por parte de las LCAs junto con los datos del análisis funcional, sugieren que la expresión de los ESAGs tiene un papel esencial en los procesos de adaptación a los distintos hospedadores. Finalmente, nuestros resultados sugieren una mayor capacidad del ganado porcino para albergar la infección de *T. b. gambiense*, apoyando datos epidemiológicos previos.

Trypanosoma brucei gambiense Adaptation to Different Mammalian Sera
is Associated with *VSG* Expression Site Plasticity

Carlos Cordon-Obras^{†§}, Jorge Cano[§], Dolores González-Pacanowska[†], Agustin Benito[§],
Miguel Navarro^{†*} and Jean-Mathieu Bart^{†§}

[†] *Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra". CSIC. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada, Spain.*

[§] *Centro Nacional de Medicina Tropical. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, Spain.*

* Corresponding Author

Tel/Fax: +34 958 181651/+34 958 181633

Mail: miguel.navarro@ipb.csic.es

Abstract

Trypanosoma brucei gambiense infection is widely considered an anthroponotic disease, although it has also been found in wild and domestic animals. Thus, fauna could be acting as reservoir, constraining the elimination of the parasite in hypo-endemic foci. To better understand the possible maintenance of *T. b. gambiense* in local fauna and investigate the molecular mechanisms underlying adaptation, we have generated adapted cells lines (ACLs) by *in vitro* culture of the parasites in different mammalian sera. *T. b. gambiense* was able to establish in all sera tested. Using specific antibodies against the variant surface glycoproteins (*VSGs*) we found that ACLs exhibited different *VSG* variants when maintained in pig, goat or human sera. Although newly detected *VSG* types were independent of the sera used, the consistent appearance of different *VSGs* suggested remodelling of the co-transcribed genes at the telomeric Expression Site (*VSG-ES*). Therefore, *Expression Site Associated Genes* (*ESAGs*) sequences were analysed to investigate possible polymorphisms. *ESAGs* 6 and 7, encoding the transferrin receptor, and *ESAG3* genotypes expressed in different ACLs were identified. In addition, we quantified the *ESAG6/7* mRNA levels and analysed transferrin uptake. Interestingly, pig and human ACLs consistently exhibited a predominant *ESAG7* genotype and higher transferrin uptake than those obtained in calf and goat sera. However, adaptation to goat serum resulted in higher genotypic diversity and increased *ESAG6/7* mRNA levels, although these ACLs showed 40% less transferrin uptake than pig and human ACLs.

Pig ACLs display phenotypic adaptation parameters closely related to human ACLs but distinct to parasites grown in calf and goat sera. The selection of different *VSG-ESs* and *ESAGs* in the ACLs together with functional analyses suggest an essential role for differential *ESAG* expression in the host adaptation processes. Finally, our data also suggest a better suitability of swine sera to maintain *T. b. gambiense* infection supporting previous epidemiological results.

Author Summary

Sleeping sickness, mainly caused by *T. b. gambiense*, is a lethal disease endemic on the African continent. Humans are often considered the unique reservoir and control campaigns have been focused on early detection and treatment of human cases. Despite considerable efforts undertaken in the past, the complete local eradication of the parasite has been rarely accomplished, even after a long absence of human cases. Wild and domestic fauna are potential reservoirs of *T. b. gambiense*, although this possibility has not been fully established. To better understand the role that fauna could be playing in the maintenance of this parasite in alternative non-human cycles, we set up an *in vitro* study challenging *T. b. gambiense* to pig, goat and calf sera. We investigated genotypic and phenotypic parameters of *ESAGs*, genes located in telomeric sites characterized by their high genetic plasticity and putatively involved in host-parasite interactions. Our study represents the first *in vitro* analysis of *T. b. gambiense* adaptation to non-human hosts and provides evidence highlighting the ability of peri-domestic animals to act as zoonotic parasite reservoirs.

Introduction

Human African Trypanosomiasis (HAT) is caused by two subspecies of hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense*, both transmitted by the tsetse fly (Diptera; Glossinidae; *Glossina* sp.), their only known vector. Despite their high biological and genetic similarity, *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense* present phenotypic differences observed at clinical and epidemiological levels [1–3]. *T. b. rhodesiense* is considered a zoonosis and triggers an acute and severe disease which, in human, leads to fatality in weeks or months if untreated. However only a few hundreds cases are reported annually. *T. b. gambiense* is considered an anthroponosis, which causes a chronic wasting disease and responsible for most of HAT cases [4–6]. Assuming that the *T. b. gambiense* reservoir is mainly human, control programs and elimination initiatives have been focused on the early detection of the parasite in this host [7–11]. However, this parasite has also been detected in a wide range of domestic and wild mammal species and several authors consider these infections relevant for the maintenance of the parasite in the epidemiological cycle under hypo-endemic conditions, where no human cases have been detected for a long time [12–15].

To investigate the role played by local fauna as reservoirs of *T. b. gambiense*, several direct or indirect approaches have been implemented. In the past, some authors attempted to compare, using molecular markers, genotypes circulating between human and animals harbouring *T. b. gambiense*. Despite epidemiological evidence of this parasite presence in others mammals, its passage from animals to human and the implication of these alternative hosts in the epidemiological cycle of the disease is still controversial [16,17]. *In vivo* follow up of infected animals was also performed to assess the ability of the parasite to survive for long periods in livestock [18]. This type of studies entails some problems such as risk of environmental contamination, low sensitivity of available tests to detect the parasite and parasitaemia fluctuation due to the host immune response.

To better control the growth conditions of the parasite and perform cellular and molecular analyses, *in vitro* approaches are preferred. Such approaches have already been applied to study *T. b. brucei* adaptation to different mammalian sera [19,20]. These studies focused on *Expression Site Associated Genes (ESAGs)* since they are good candidates for being involved in adaptation because of the large repertoire of families and different alleles. In addition, they are polycistronically transcribed in the telomeric Expression Site (ES) along with the protein involved in antigenic variation: Variant

Surface Glycoprotein (*VSG*) [21,22]. *T. b. brucei* has around 15 *VSG*-ESs but only one is transcribed at a given time while the others remain repressed, providing the expression of a particular combination of *ESAGs* in a mutually exclusive manner [23]. The transcriptional activation/inactivation of genes in the *VSG*-ESs is a highly regulated mechanism (see Figure 2A)[24–27], potentially allowing the parasite to quickly respond to any environment change. In addition, a correlation between different animal sera and the expression of polymorphic transferrin receptors encoded by *ESAG6* and 7 genes has been previously described in *T. brucei brucei* [28]. Thus, it was proposed that the parasite receptor variability provides a range of affinities to the transferrin from different mammalian hosts, which may differ by 30% in amino acid sequence [19,29]. Comparable studies have never been conducted for *T. b. gambiense* and little is known about *ESAG* sequences and the telomeric *VSGs* that are expressed, since complete *VSG*-ESs sequences of this parasite are not available [30].

From field surveys, epidemiological data suggest that a peri-domestic *T. b. gambiense* life cycle, involving mammals such as pigs and goats, may occur in West Africa [12,15,31]. The present study investigates the ability of this parasite to infect such mammals and to retain the human serum resistance using an *in vitro* approach. In addition, genotyping of *ESAG6*, *ESAG7* and *ESAG3* genes and assessment of *ESAG6/7* mRNA levels and transferrin uptake were conducted to better understand the molecular mechanisms that mediate adaptation responses.

Results and Discussion

***T. b. gambiense* adapts to different mammalian sera and retains infectivity in humans**

Our first evaluation of the adaptation process was to measure the growth rate of cell lines maintained in different sera. Three goat (GS1, GS2 and GS3), three pig (PS1, PS2 and PS3) and four human (HS1, HS2, HS3 and HS4) independent adaptation experiments were performed. Duplication time of the adapted cell lines (ACLs) before and after twenty-five passages is shown in Figure 1. Human (from 13.2 ± 2.28 to 8.94 ± 0.49 hours) and pig (from 16.17 ± 1.9 to 9.59 ± 0.53 hours) ACLs exhibited a significant reduction in duplication time whereas goat ACLs (from 14.57 ± 2.63 to 11.1 ± 1.14 hours) showed no statistical significant decrease. Pig ACLs presented the largest duplication time reduction after the adaptation (40.6% lower than pre-adapted line) whereas goat ACLs showed a drop of 23.8%.

An effective reservoir should be able to harbour the pathogen for long-term periods while the parasite retains the capacity to infect other hosts. It is widely assumed that *T. b. gambiense* has a constitutive resistance to normal human serum (NHS) contrary to *T. b. rhodesiense*, which acquires resistance to NHS only when the *SRA* (Serum Resistance Associated) gene, a particular *ESAG*, is expressed from the active *VSG*-ES [32–35]. Once adapted, our cells were cloned and tested against NHS to address whether, even after a long-term passage in other mammals, *T. b. gambiense* ACLs could still proliferate in humans. All the studied clones (27 from calf, 17 from pig and 46 from goat sera) were fully resistant to NHS, while sensitive *T. b. brucei* controls systematically were lysed within 16 hours, confirming the constitutive nature of the NHS resistance in *T. b. gambiense*. This feature would potentially enable this parasite to infect humans after being maintained in a wild cycle.

A previous survey dealing with the maintenance of *T. b. gambiense* infection in animals under controlled conditions focused on the screening of state parameters and parasite detection in experimentally infected pigs [18]. Data demonstrated that *T. b. gambiense* causes an asymptomatic infection in this species evolving towards spontaneous cure in 3-4 months. No molecular analysis was further performed in this work. Our *in vitro* approach overcomes a possible host immune response and variability allowing us to analyse the molecular basis associated with the adaptation process.

Adaptation to mammalian sera is associated with antigenic variation

Previous work suggested that the parasite's ability to adapt to mammalian hosts is linked to the differential expression of polymorphic genes of the *VSG*-ESs, a polycistronically transcribed locus with high genetic plasticity [22,36]. To investigate the role of *VSG*-ES expression in the adaptation of *T. b. gambiense* to different hosts, we first analysed *VSG* expression in the different ACLs. The *VSG* is a very abundant protein allowing the direct visualization in total protein extracts of the ACLs in a polyacrylamide gel. The Figure 2B showed an abundant protein band that varies in size among different ACLs, suggesting that the *VSGs* expressed in the ACLs were different from those expressed in the original line, maintained in calf foetal serum (CFS). The high intensity band at 70 kDa observed in the HS1 line was identified by peptide mass fingerprinting as contaminant human albumin.

To characterize these prominent bands, we generated antibodies against the *VSGs* expressed in the original cell line (LiTat 2.1) and HS1 line (LiTat 3.1) (see Material and

Methods). Western Blot (WB) analysis using a mouse monoclonal antibody (mAb) against the original *VSG* (CFS ACL) suggested specificity since recognized the *VSG* exclusively in this ACL (Figure 2C). Likewise, the rabbit antiserum developed against the amino terminal fragment of the LiTat 3.1 only recognized the *VSG* expressed in the HS1 ACL. Although we did not isolate and characterize other expressed *VSGs* in pig and goat ACLs, the different size observed by protein staining and the lack of detection by WB using anti-LiTat 2.1 and anti-LiTat 3.1 antibodies suggested that these protein bands correspond to different *VSGs*. Thus, we detected at least five distinct *VSGs* during the adaptation assays.

Immunofluorescence (IF) experiments were further performed with the specific antibodies (Figure 3A). IF analysis using mAb anti-LiTat 2.1 revealed that nine out of ten ACLs expressed a different dominant *VSG*. Parasites selected in pig and goat sera yielded a population where at least 93.5% of cells expressed a *VSG* different from the original one. Three out of the four human ACLs (lines HS1, HS2 and HS4), also expressed different *VSGs* (100%, 96.5% and 87.4% of *VSG* change respectively), and only a single human ACL (HS3) maintained the original LiTat 2.1.

IF analysis using anti-LiTat 3.1 showed that six out of the ten new ACLs expressed in their surface LiTat 3.1 as the more abundant *VSG*: three cultures of human ACLs (99.8%, 93% and 85.6%), two of goat (79.5% and 92.2%) and one of pig (91.5%). The two remaining pig ACLs expressed neither LiTat 2.1 nor LiTat 3.1, while only 30% of the GS3 goat ACLs expressed LiTat 3.1 (Figure 3B). The fact that LiTat 3.1 is the most frequently selected *VSG* variant is most likely due to the presence in the original population we used for selection. In addition, a smaller repertoire of *VSG*-ESs in *T. b. gambiense* in comparison to *T. b. brucei* may also account for this observation [30]. Alternatively, LiTat 3.1 could have a higher recombination rate due to sequence homology with the LiTat 2.1 *VSG*-ES.

These results suggest that the type of *VSG* expressed is independent of the serum used for selection. However in all cases except one we detected a switch in the *VSG* expressed in the ACLs, suggesting that *VSG*-ES remodelling, including changes in the co-expressed *ESAGs*, is involved in the adaptation process.

***ESAG7* and *ESAG3* show a specific genotype in pig and human ACLs**

Differential *VSG* expression after growth selection using different animal sera has been previously reported in *T. b. brucei* [28,37]. In particular, expression of polymorphic

ESAGs has been proposed to explain the adaptation mechanism to mammalian sera. Distinct expression of *ESAGs* 6 and 7, encoding the polymorphic transferrin receptor (TfR) [38], may have significant effects on the binding affinity for diverse mammalian transferrins [19,37]. However, very few studies have focused on *ESAGs* in *T. b. gambiense* [30].

In order to investigate whether adaptation in the ACLs generated in this study could be linked to specific TfR selection, we first characterized the cDNA sequence diversity of *ESAGs* 6 and 7. *ESAG3* was also included in the genotyping analysis. Despite its unknown function, it shows a signal peptide in the N-terminal extreme, which putatively targets it to the cellular surface, suggesting an interaction with the environment [22].

Sequence analysis of expressed *ESAG6/7* and *ESAG3* was performed with cDNAs isolated from human, pig, goat and CFS ACLs. Likewise, sequences were obtained from genomic DNA as a control for polymorphism detection, in order to evaluate that selected primers did not bias the amplification products. Overall, these genomic clones represent the genotypes found in cDNA sequencing (data not shown). The same set of primers was used to amplify *ESAG6* and 7 and sequence alignments allowed us to identify both genes and different genotypes.

We obtained five *ESAG7* and four *ESAG6* genotypes, defined as single nucleotide changes in the sequence. Table 1 and Figure 4 detail the genotype frequency obtained for each ACL and Figure S1A shows a clustering tree for both genes. Average DNA diversity was 4.56% (ranging from 1.65% to 6.07%) and 3.88% (from 0.15% to 7.58%) for *ESAG7* and *ESAG6* respectively (in terms of number of nucleotide substitutions per site). Interestingly, protein alignments of the transferrin binding region yielded only two types of *ESAG6* and four of *ESAG7* (see Figure 4A and Table 1). Importantly, we observed a specific significant association between serum and *ESAG7* type. Genotype *Tbg7_5* was associated to pig ACLs, whereas *Tbg7_1* was significantly correlated to human ACLs. We did not find an overall significant specific serum-genotype association for the *ESAG6* gene, although residue analysis revealed a preference of pig ACLs for *Tbg6_4* genotype. A similar low diversity of *T. b. gambiense ESAG6* has been reported previously [30]. The main genotypes, *Tbg6_4* and *Tbg6_3*, correspond to type 10 and 7 respectively, described by Young *et al.* [30]. *Tbg6_1* shares 99% homology (675/676 nucleotides) with type 8 and *Tbg6_2* is highly similar to types 7 and 5 (99% homology, 674/676 in both cases). This previous work suggested that *T. b. gambiense*

shows less *ESAG6* diversity because it is highly adapted to the human host. Probably most *T. b. gambiense* *VSG*-ESs contain *ESAG6* copies encoding high-affinity TfR for human transferrin.

Van Luenen *et al.* [37] investigated in detail changes in *T. b. brucei* *ESAG6/7* expression upon adaptation to growth in dog serum. Their data demonstrated that the parasite might respond to changes in serum either by *in situ* switching to another *VSG*-ES to express a new *ESAG6/7* with higher affinity for dog transferrin, or by upregulation of *ESAG7* expression from an inactive *VSG*-ES promoter-proximal region, resulting in a residual expression of a different *ESAG7*. A similar upregulation of *ESAG6/7* from an inactive *VSG*-ES was described after deletion of these genes from the active *VGS*-ES [39]. We also detected specific dominant *ESAG6/7* sequences in some ACLs and others less represented, suggesting a residual expression from inactive *VSG*-ESs. In order to investigate whether the different *ESAG6/7* sequences coming from particular ACLs were due to inactive *VGS*-ESs partial expression or to population variability [40], we cloned two human ACLs (HS2 and HS3) and sequenced the *ESAG6/7* from two clonal subpopulations of each line. We found two different *ESAG7s* genotypes in the same clone, suggesting that polymorphisms in transferrin sites should not be entirely attributed to diversity in the population (data not shown).

It has been reported that after *T. b. brucei* adaptation to canine serum, *ESAG7* genotypes distinct to the original wild type line were frequently obtained, whereas the *ESAG6* type usually remained constant [37]. These data are consistent with our results, suggesting that *ESAG7* diversity, rather than *ESAG6*, is decisive in adaptation to a specific host.

Next, we isolated and sequenced the *ESAG3* expressed in the ACLs. This analysis yielded thirteen different genotypes (see Figures 4, 5B, S1B and Table 2). Similar to *ESAG6/7*, we detected a more abundant *ESAG3* type in human and pig ACLs. Average DNA diversity was 3.7% (ranging from 0.12% to 6.24%), being grouped in four polymorphic regions (Figure 5B). We observed significant correlation between *Tbg3_13* and *Tbg3_1* genotypes with pig ACLs and *Tbg3_9* with human ACLs (Table 2). However, HS4 had no predominant genotype and expressed at least four different types.

The predicted protein encoded by genotype *Tbg3_1* associated with PS1 and PS2 ACLs, was a truncated version due to the presence of a stop codon insertion at the amino acid position 232. Since *ESAG3* function is unknown, the implication of this partial genotypic selection is difficult to assess. *ESAG3* is 368 amino acid protein, with an

amino terminal signal peptide, but lacking transmembrane or anchoring domains. Its release into surrounding medium under undetermined conditions has been hypothesized [22]. Secreted proteins have been described as important to parasite-host cross-talk in other organisms such as *Plasmodium berghei*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Toxoplasma gondii* or *Bacillus anthracis* [41–44]. However, we cannot rule out the possibility that the *ESAG3* apparent correlation with sera could be masked by the selection of other closely linked *ESAG*/s in the *VSG*-ES. Further research about *ESAG3* function would be extremely useful in order to better understand these results.

The *ESAG3* genotypic selection in human and pig ACLs, together with the lack of *VSG*-serum correlation can be explained by *VSG*-ES remodelling. It is possible that some of the active *VSG*-ESs observed in this study lack full-length copies of *ESAG3*. In human and pig ACLs, the selected genotypes (*Tbg3_1*, *Tbg3_9* and *Tbg_13*) might be a result of insertions of fragments coming from either basic copies or from other ESs by gene conversion driven by the high sequence homology between telomeric *VSG*-ES [45,46]. Recombination between *VSG*-ESs during a selection procedure has been described in *T. b. brucei* during *in vitro* selection using dog serum [37] and after adaptation to human HDL [47]. As described above, some ACLs expressed a truncated *ESAG3* (*Tbg3_1*) containing a stop codon insertion, which is particularly abundant in the PS1 and PS2 ACLs. Likewise, in *T. b. brucei* five telomeric *VSG*-ES with no functional copy of *ESAG3* have been described [46], including BES13/TAR56, which contains a promoter region highly similar to that of the *T. b. gambiense* *VSG*-ESs [30].

Although some *ESAG3* non-telomeric copies can exist as pseudogenes in subtelomeric arrays both in *T. b. gambiense* [48] and *T. b. brucei* [49], the transcription from *VSG*-ESs by RNA polymerase I is much more efficient than a possible transcription of genes mediated by RNA polymerase II from chromosomal internal positions [22,50]. Therefore, genotypes from active *VSG*-ESs are likely the predominant type in the cDNA utilized as template in our genotyping analysis. Indeed, *Tbg3_9*, the most common type found in our study, corresponds to *ESAG3* copy from an expression site (TbgBES11) previously obtained during *T. b. gambiense* genome sequencing (GenBank AEX08459.1) [48]. *Tbg3_1*, another major genotype, shares 98% similarity with *ESAG3* from TbgBES17 (GenBank AEX08464.1). Interestingly, 6 out of 7 substitutions detected between these two sequences are concentrated in the polymorphic region III, including the stop codon and the ACN domain exclusive of this genotype. *Tbg3_13*, expressed only by PS3, is 97% similar to TbgBES17 *ESAG3* as well, however

substitutions are more heterogeneously distributed than *Tbg3_1*. The expression pattern of *ESAG3* in human and pig ACLs together with the similarity with previously reported data suggest that sequences obtained in these ACLs derived from the active *VSG*-ES.

In summary, specific genotypes of *ESAGs* were identified in human and pig ACLs. This genetic selection could confer phenotypic advantages during the adaptation process and be directly related to the increased competency in growth (Figure 1) and transferrin uptake (see below) of the parasites in both human and pig sera.

***ESAGs* genotype patterns suggest less efficient adaptation in goat serum**

Multiple expression of *ESAG6/7*, genes located close to the promoter, in five ACLs strongly suggested the existence of residual expression from inactive *VSG*-ESs. This is particularly remarkable in goat ACLs, which showed the greatest *ESAG6/7* expression diversity (Figure 4 and Table 1).

Overall, goat ACLs yielded a significant association with the *Tbg7_3* genotype, but since only GS1 expressed it, this observation was not attributed to specific serum selection. We did not detect any expressed *ESAG6* genotype in this line, probably due to the great amount of *ESAG7* transcripts in proportion (see Figure 6B). GS2 and GS3 tend to preferentially express genotype *Tbg7_1*, although these latter differences were not statistically significant (Table 1).

GS2 and GS3 expressed distinct *VSGs* on the surface (Figure 3), however these ACLs showed a similar *ESAG6/7* pattern that CFS line, suggesting a recombination event downstream of *ESAG6*, replacing the previously expressed *VSG* LiTat 2.1. Alternatively, we cannot rule out the possibility of *in situ* activation of a new *VSG*-ES that contains the same *ESAG6/7* type, since *T. b. gambiense* *ESAG6/7* sequence polymorphism is very low [30]. Thus, identical *ESAG6/7* types can be expressed from different *VSG*-ESs in some of the ACLs. In GS1, however, *in situ* switching may took place, since the *VSG* and *ESAG7* types are different to those of the CFS ACL.

Similar to *ESAG7*, the pattern of *ESAG3* expression in goat ACLs showed the highest degree of polymorphism. Although a significant association was found between goat serum and the *Tbg3_2* genotype, this type was not dominant in any of the lines (Table 2).

Contrary to *ESAG6/7*, residual expression from inactive *VSG*-ESs seems unlikely in *ESAG3* since it is usually located far away from the promoter. CFS and goat ACLs

could yield a diverse genotype pattern coming from chromosome internal copies and/or other *VSG*-ESs, as described for the *ESAG1* deletion [51].

Although non-clonal populations were used to obtain the ACLs, after adaptation most of the lines expressed a dominant *VSG* at more than 80% frequency. Mixing of populations, especially in GS3, could be biasing the perception of genotype patterns. Nevertheless, it would be expected that predominant genotypes appear, independently of the expressed *VSG*, if the gene was under selection pressure, as might occur in human and pig ACLs with *ESAG7* and *ESAG3*.

In summary, contrary to human and pig ACLs, we did not detect a marked genotypic selection in goat serum. Rather, goat ACLs expressed wider genotype diversity, probably due to transcription from silent *VSG*-ES or from chromosomal internal copies. This variability suggests an adaptation response as observed elsewhere when *T. b. brucei* is exposed to canine serum [20,37]. Together with the lower growth rate detected in goat ACLs (Figure 1), these data suggests a lower fitness of the parasite in this serum than in human or pig sera.

Pig and human ACLs show higher human transferrin uptake

Efficient uptake of transferrin by the TfR is essential for parasite growth [52] and host anti-TfR antibodies can compete with transferrin binding to TfR underscoring the importance of a high TfR/transferrin affinity [19]. However, in *T. b. gambiense*, no studies on transferrin uptake have been described.

To gain insight on the role of differential *ESAG6/7* expression in the adaptation process, we studied transferrin uptake in the different ACLs. Maximum uptake was achieved between 5 to 10 minutes of incubation in all cases (Figure 6A). Human and pig ACLs showed the most efficient uptake with $88.63 \pm 5.44\%$ and $89.58 \pm 13.22\%$ of maximum at 5 minutes incubation, respectively.

Significant differences were detected in transferrin uptake when all ACLs were compared. Pair wise *post-hoc* analyses showed that goat serum ACLs did not significantly differ from the CFS line at any incubation time, whereas pig and human ACLs uptake increased by 60% respective to the other lines ($p= 0.017$ and $p= 0.013$ at 5 minutes incubation time, respectively). This increased uptake in pig ACLs could be attributed to the specific *ESAG7* genotype (*Tbg7_5*) expressed in these lines (Figure 4 and Table 1), which seems to be suitable for human transferrin. Human ACLs expressed mainly *Tbg7_1* genotype as well as CFS, GS2 and GS3, however the former showed

consistently higher mRNA levels of *ESAG7* compare to CFS ACL (ranged between 4.95 ± 0.34 to 7.81 ± 1.13 folds respective to CFS ACL, Figure 6B). We used human transferrin for uptake experiments, thus these results maybe a consequence of human ACLs selection of clones that expressed higher levels of *ESAG7* during the adaptation process. GS1 and GS3 showed even higher expression of *ESAG7* mRNA levels than human ACLs (20.16 ± 0.31 and 13.4 ± 0.99 folds respective CFS ACL), however this did not entail a higher transferrin uptake. As we did not observe a more efficient phenotype, we could not attribute this finding to a clone selection as occurs in human ACLs. Rather, we hypothesize that continuous culture with goat serum resulted in upregulation of mRNA levels of *ESAG6/7* as previously described in *T. b. brucei* using dog serum [20], leading to a diverse expression pattern. Altogether, these results are in accordance to the genotyping and culture experiments, suggesting that *T. b. gambiense* parasites were less efficiently adapted to goat serum compared to pig or human species.

Conclusions

T. b. gambiense was able to efficiently grow *in vitro* in all mammalian sera tested while retaining the ability to resist NHS. However, selection of different *VSG* variants has been consistently observed in this parasite after adaptation independently of the serum used. This suggests that while the *VSG* type is not associated to sera selection, expression remodelling of the *VSG-ES ESAGs* is a prerequisite. *ESAG* polymorphism analysis showed a higher degree of variations in goat than in pig and human ACLs, which is consistent with the more efficient growth in pig and human sera and the field reservoir studies.

After adaptation to pig and human sera, ACLs exhibited an increase in human transferrin uptake, probably due to the expressed *ESAG7* genotype in pig ACLs and augmented mRNA levels for this gene in human lines. Goat ACLs displayed some particular features. They showed a less pronounced decrease in duplication time after adaptation, a higher *ESAG6/7* genotype diversity and increased levels of *ESAG6/7* transcripts, but still lower transferrin uptake than human and pig ACLs. These data strongly suggest a modulated adaptation response, as occurs in *T. b. brucei*, immediately after being exposed to dog serum [37]. Parasites seem unable to attain a complete and stable adaptation in goat serum, since they still show the short-term quick responses after at least seventy-five days of culture.

ESAG3 genotypes also seemed to correlate with the serum employed in the culture, showing specific types expressed mainly in human and pig ACLs, though it could be an effect of another nearby *ESAG* recombination. Further research about *ESAG* variability and function would be helpful to elucidate the role of these genes in parasite-host crosstalk.

In the field, parasites have been found in naturally infected livestock species such as goats and pigs. Our results support the hypothesis that these animals harbour *T. b. gambiense* for long-term periods. Molecular analyses revealed that pig ACLs displayed similar features to human ACLs, strengthening the hypothesis that swine are the main candidate to act as animal reservoirs of *T. b. gambiense* infection; however other animal species, either domestic or wild, should not be dismissed.

These findings are highly relevant considering that human disease has been successfully controlled in several endemic foci and elimination is in progress in many areas [53]. Hence, a control strategy only based on detection and treatment of human cases would not guarantee the elimination of *T. b. gambiense* in endemic foci, where animal reservoirs could be present.

Material and Methods

Ethics statement

Human blood samples were taken from healthy donors, who provided written informed consent for the collection of samples. These samples were specifically obtained for this study.

In vitro* culture of *Trypanosoma brucei gambiense

Bloodstream forms of *Trypanosoma brucei gambiense* Eliane strain (MHOM/CI/52/ITMAP 2188) were used in all experiments [54]. The original line was routinely grown in HMI-9 medium [55] supplemented with 20% calf foetal serum (CFS). Cultures were maintained at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO₂.

For adaptation assays, we maintained parasites in HMI-9 medium adding 20% of different mammalian sera (goat, pig, human and calf) with a starting density of 5×10^4 parasites/ml. Goat and pig sera were obtained from Sigma-Aldrich® whereas CFS was provided by Gibco®. We also tested normal human serum (NHS) from Sigma-Aldrich® but no viable cultures were achieved since parasites usually collapsed after 7-14 days. This drawback led us to use human serum from healthy donors. Different batches of NHS were used in order to avoid potential selection bias: the batch 1 was a pooled serum from several donors, the batch 2 and 3 came from two different individuals and the batch 4 was a mix of both 2 and 3 sera. Three independent adaptation experiments were performed for pig and goat sera. All sera were inactivated (56 °C for 30 minutes) prior mix with the medium. Cultures never reached densities over 2×10^6 parasites/ml during the adaptation before being diluted. After 25 passages (75-105 days) in these media, we labelled the cultures as Adapted Cell Line (ACL) for the corresponding serum. We did not use clonal populations in this study since it was assumed that suspected variability inside population would speed up the selection of any involved gene.

Disposable Neubauer chambers were used to manually count parasite density. We estimated duplication time for each ACL in their corresponding sera. The measure was carried out starting with 5×10^4 parasites and counting at 48 hours in 24-well plaques in 1 ml of culture medium.

To assess the normal human serum (NHS) resistance, we cloned by limiting dilution ACLs coming from pig, calf and goat sera. All clones were exposed to 10% NHS for 16

hours. This assay was conducted in 1 ml culture medium in 24-well plates with a starting density of 1×10^5 parasites/ml. A cell line (*T. b. brucei* 1.2, clone 221a derived from Lister 427) sensitive to NHS was used as control to ensure the trypanolytic activity of the serum.

Antibodies anti-*VSG* production

The *VSG* expressed in the original line (LiTat 2.1) was purified by direct isolation from 4×10^8 parasites following the protocol described elsewhere [56]. We obtained monoclonal antibodies (mAb) by inoculation of 50 ug of the isolated protein into BALB-C mouse using standard immunization procedures (see for example [25]). Six hybridomas were initially selected by standard monoclonal selection. The clone 2H5G3, which showed to be the most suitable for immunofluorescence (IF) and Western Blot (WB) analysis, was used for all assays.

The *VSG* expressed in the first human ACL (named LiTat 3.1) obtained in our lab was amplified from cDNA with primers annealing in splice leader sequence and a 3' conserved region from all *T. brucei* *VSGs* [57]. RT-PCR product was cloned in pGEM[®]-T (Promega[®]) and sequenced. N-terminal domain was expressed as a fusion with histidine in Single Step (KRX) *E. coli* Competent Cells (Promega[®]) with a pET-28a vector (Novagen[®]) and induced with 0.1 mM IPTG and 0.1% rhamnose for 3 hours at 37°C. Soluble recombinant protein was purified with Ni Sepharose[™] 6 Fast Flow (GE Healthcare[®]) and inoculated into rabbit following standard immunization protocols. For both *VSGs*, peptide mass fingerprint was carried out to check their correspondence with nucleotide sequences. These sequences are available in GenBank database with KC257432 (LiTat 2.1) and KC257433 (LiTat 3.1) access numbers. We were unable to isolate and/or amplify *VSGs* expressed in the other ACLs.

Immunofluorescence

Cells were harvested by centrifugation at 1400 g for 10 minutes at room temperature, washed, and resuspended in TDB-glucose (KCl 5 mM, NaCl 80 mM, MgSO₄ 1 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, NaH₂PO₄ 2mM, glucose 20 mM, pH 7,4). 2×10^5 cells were dried on slide, fixed in 1% paraformaldehyde (PFA) for 1 hour, washed with PBS, blocked with 0.5% blocking reagent (Roche[®]) and then incubated with mAb anti-LiTat 2.1 (1:10) and/or rabbit antiserum anti-LiTat 3.1 (1:5000) diluted in 0.5% blocking reagent. Alexa-Fluor[®] 488 (anti-mouse) and Alexa-Fluor[®] 594 (anti-rabbit) were used as secondary

antibodies (Invitrogen™). Cells were DAPI stained and visualized with a fluorescence microscope Zeiss, type Axio Imager A1, equipped with the AxioVision system. Images were mounted using ImageJ version 1.44 and Photoshop CS5 (Adobe Systems®) extended (version 12.1 x64).

Genotyping

Total RNA was extracted from 5×10^7 bloodstream form trypanosomes using High Pure RNA Isolation Kit (Roche®) according to the manufacturer's recommendations. The amount of total RNA was quantified by spectrophotometric assay with NanoDrop® system. cDNA was obtained from retrotranscription (RT) of 1 µg RNA using 300 nmol random primers in a 25 µl total volume with 100 units of SuperScript™ III First-Strand Synthesis System (Invitrogen™) and was conducted for 1 hour at 50°C. Partial open reading frames from *ESAG3* and *ESAG6/7* fragments were amplified from cDNA of each ACL (5U7:5' - TGTGCTGTTGGCTCTTTTGGGA-3' and Tbg6/7L: 5'-CAGCACTCCCAACAATAAACTGAAC-3' for *ESAG6* and *ESAG7* ORF -open reading frame- and E3U: 5'-TCATGCAACACAAGGATGGT-3' and E3L: 5'-TCCCCATATCCTTCGAATTA-3' for *ESAG3*).

Due to the lack of *T. b. gambiense* telomeres in databases, primers were designed from the published sequences of *T. brucei* TREU927. PCR was performed with 1 µl of cDNA, 1X buffer (10 mM Tris-HCl, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8.3), 100 µM each of dNTPs, 0.5 µM each primer, 1 U Fast Start Taq DNA polymerase (Roche®) and double distilled water (DDW) until reach 50 µl final volume. Samples were initially heated at 93 °C for 2 min and then submitted to 30 amplification cycles (93 °C for 30 seconds, 60 °C for 45 seconds and 72 °C for 90 seconds) in a Bio-rad® T100™ Thermal Cycler. Genomic DNA of *T. b. gambiense* was amplified as positive control. Retrotranscription negative controls (RNA not submitted to RT) were systematically integrated. RT-PCR products were cloned in pGEM®-T vector (Promega®) and sequenced. Sequences were manually visualized in order to check their integrity and ambiguous samples were removed from the analysis. Alignment was performed with Bioedit Sequence Alignment Editor 7.0.9.0. Sequences are available in GenBank under following accession numbers: *ESAG7* genotypes [KC257410-KC257414], *ESAG6* genotypes: [KC257415-KC257418], *ESAG3* genotypes [KC257419-KC2574131]. Clustering trees were elaborated with sequenced samples using Neighbour-Joining method with MEGA4 software (Bootstrap=1000). Distances were computed using the

Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site.

Transferrin uptake

2×10^6 trypanosomes were harvested and washed with TDB-glucose plus 1% BSA, resuspended in 250 μ l in the same buffer and incubated for 10 minutes at 37 °C. Then, 5 μ g of Human Transferrin Alexa Fluor[®] 488-conjugated (Invitrogen[™]) were added. Incubations were carried out for 0 (no transferrin), 1, 2.5, 5, 10 and 20 minutes at 37 °C. Cells were then fixed 1 hour at 4 °C in 1% PFA diluted in cold PBS. Parasites were finally washed twice with PBS and transferrin uptake was measured by FACS analysis. Labelled cells were analysed with a BD FACSCalibur[™] flow cytometer (BD Biosciences[®]).

RT-qPCR

Quantitative PCR assays were performed in an iCycler IQ[™] real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories[®]); 20 μ l reactions were set up containing 1 μ l cDNA (see Genotyping section), 0.5 μ M of specific forward and reverse primers, 8 μ l of DDW and 10 μ l of PerfeCta[™] SYBR[®] Green SuperMix for iQ (Quanta Biosciences[®]). Primers were designed in conserved regions of the *ESAG6* gene according to sequences obtained during genotyping analysis (qTbg6/7U: 5'-ATTTCCTTCGGTAGCTTGGG-3' as common primer, qTbg6L: 5'-TTCACCACCCTCAACGTACA for *ESAG6* and qTbg7L: 5'-CACCGTATTCTCCCCCTTTT-3' for *ESAG7*).

The gene expression level was measured using the comparative cycle threshold CT method according to Pfaffl, 2001 [58]. The relative expression of different ACLs was normalized with *ATM* (PI3 Kinase-like -Tbb927.2.2260-) as housekeeping gene. Another housekeeping gene, *Myosin*, was included as control. All data were analyzed using Bio-Rad CFX Manager[™] software (version 1.6).

Statistical analysis

We used Student's T test to assess significant differences in the growth of lines before and after adaptation and one-way ANOVA to compare transferrin uptake. Likelihood Ratio Test, completed with residues analysis, was used to detect significant serum-genotype associations. Confidence intervals (CI) were set at 99% in all tests. IBM[®] SPSSStatistics[®] software (version 20) was used to perform all statistical analysis.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Dr. Liam Morrison for providing us with *T. b. gambiense* ELIANE strain, and to Dr. Daria Van Tyne for critical reading of this manuscript. We are especially grateful to I. Vidal for technical support.

References

1. Hoare, C. A. (1972) The trypanosomes of mammals. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
2. Blum JA, Neumayr AL, Hatz CF (2011) Human African trypanosomiasis in endemic populations and travellers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* .
3. Gibson WC (1986) Will the real *Trypanosoma b. gambiense* please stand up. *Parasitol Today* 2: 255-257.
4. Kuzoe FAS, Schofield CJ (2004) Strategic review of traps and targets for tsetse and African Trypanosomiasis control. Report of Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR) TDR/IDE/TRY/05.1.
5. Checchi F, Filipe JA, Barrett MP, Chandramohan D (2008) The natural progression of gambiense sleeping sickness: what is the evidence? *PLoS Negl Trop Dis* 2: e303.
6. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC et al. (2003) The trypanosomiases. *Lancet* 362: 1469-1480.
7. Simarro PP, Franco JR, Ndongo P, Nguema E, Louis FJ et al. (2006) The elimination of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Trop Med Int Health* 11: 636-646.
8. Louis FJ, Simarro PP, Lucas P (2002) [Sleeping sickness: one hundred years of control strategy evolution]. *Bull Soc Pathol Exot* 95: 331-336.
9. Robays J, Bilengue MM, Van der SP, Boelaert M (2004) The effectiveness of active population screening and treatment for sleeping sickness control in the Democratic Republic of Congo. *Trop Med Int Health* 9: 542-550.
10. Lutumba P, Robays J, Miaka mia BC, Mesu VK, Molisho D et al. (2005) Trypanosomiasis control, Democratic Republic of Congo, 1993-2003. *Emerg Infect Dis* 11: 1382-1388.

11. Simarro PP, Jannin J, Cattand P (2008) Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? PLoS Med 5: e55.
12. Cordon-Obras C, Berzosa P, Ndong-Mabale N, Bobuakasi L, Buatiche JN et al. (2009) *Trypanosoma brucei gambiense* in domestic livestock of Kogo and Mbini foci (Equatorial Guinea). Trop Med Int Health 14: 535-541.
13. Herder S, Simo G, Nkinin S, Njiokou F (2002) Identification of trypanosomes in wild animals from southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR). Parasite 9: 345-349.
14. Njiokou F, Laveissiere C, Simo G, Nkinin S, Grebaut P et al. (2006) Wild fauna as a probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. Infect Genet Evol 6: 147-153.
15. Simo G, Asonganyi T, Nkinin SW, Njiokou F, Herder S (2006) High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon. Vet Parasitol 139: 57-66.
16. Jamonneau V, Ravel S, Koffi M, Kaba D, Zeze DG et al. (2004) Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Cote d'Ivoire. Parasitology 129: 693-702.
17. Simo G, Cuny G, Demonchy R, Herder S (2008) *Trypanosoma brucei gambiense*: Study of population genetic structure of Central African stocks using amplified fragment length polymorphism (AFLP). Exp Parasitol 118: 172-180.
18. Penchenier L, Alhadji D, Bahebegue S, Simo G, Laveissiere C et al. (2005) Spontaneous cure of domestic pigs experimentally infected by *Trypanosoma brucei gambiense*. Implications for the control of sleeping sickness. Vet Parasitol 133: 7-11.

19. Gerrits H, Mussmann R, Bitter W, Kieft R, Borst P (2002) The physiological significance of transferrin receptor variations in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 119: 237-247.
20. Mussmann R, Engstler M, Gerrits H, Kieft R, Toaldo CB et al. (2004) Factors affecting the level and localization of the transferrin receptor in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 279: 40690-40698.
21. Horn D, McCulloch R (2010) Molecular mechanisms underlying the control of antigenic variation in African trypanosomes. *Curr Opin Microbiol* 13: 700-705.
22. Pays E, Lips S, Nolan D, Vanhamme L, Perez-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.
23. Horn D (2004) The molecular control of antigenic variation in *Trypanosoma brucei*. *Curr Mol Med* 4: 563-576.
24. Navarro M, Gull K (2001) A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature* 414: 759-763.
25. Landeira D, Bart JM, Van TD, Navarro M (2009) Cohesin regulates VSG monoallelic expression in trypanosomes. *J Cell Biol* 186: 243-254.
26. Navarro M, Cross GA (1998) In situ analysis of a variant surface glycoprotein expression-site promoter region in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 94: 53-66.
27. Berriman M, Hall N, Sheader K, Bringaud F, Tiwari B et al. (2002) The architecture of variant surface glycoprotein gene expression sites in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 122: 131-140.
28. Bitter W, Gerrits H, Kieft R, Borst P (1998) The role of transferrin-receptor variation in the host range of *Trypanosoma brucei*. *Nature* 391: 499-502. 10.1038/35166 [doi].

29. Isobe T, Holmes EC, 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*. *J Mol Evol* 56: 377-386.
30. Young R, Taylor JE, Kurioka A, Becker M, Louis EJ et al. (2008) Isolation and analysis of the genetic diversity of repertoires of VSG expression site containing telomeres from *Trypanosoma brucei gambiense*, *T. b. brucei* and *T. equiperdum*. *BMC Genomics* 9: 385.
31. Njiokou F, Sima FO, Njitchouang GR, Nimpaye H, Cuny G et al. (2005) Importance of domestic animal reservoir of *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. 28th Meeting ISCTRC Addis Ababa, Ethiopia .
32. Capewell P, Veitch NJ, Turner CM, Raper J, Berriman M et al. (2011) Differences between *Trypanosoma brucei gambiense* Groups 1 and 2 in Their Resistance to Killing by Trypanolytic Factor 1. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1287.
33. Vanhamme L (2010) The human trypanolytic factor: a drug shaped naturally. *Infect Disord Drug Targets* 10: 266-282.
34. De GC, Imberechts H, Matthyssens G, Van MN, Hamers R (1989) A gene expressed only in serum-resistant variants of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Mol Biochem Parasitol* 36: 169-176.
35. De GC, Chimfwembe E, Kihang'a WJ, Bajyana SE, Hamers R (1992) Only the serum-resistant bloodstream forms of *Trypanosoma brucei rhodesiense* express the serum resistance associated (SRA) protein. *Ann Soc Belg Med Trop* 72 Suppl 1: 13-21.
36. Borst P, Rudenko G, Taylor MC, Blundell PA, Van LF et al. (1996) Antigenic variation in trypanosomes. *Arch Med Res* 27: 379-388.
37. van Luenen HG, Kieft R, Mussmann R, Engstler M, ter RB et al. (2005) Trypanosomes change their transferrin receptor expression to allow

effective uptake of host transferrin. *Mol Microbiol* 58: 151-165.
MMI4831 [pii];10.1111/j.1365-2958.2005.04831.x [doi].

38. Schell D, Evers R, Preis D, Ziegelbauer K, Kiefer H et al. (1991) A transferrin-binding protein of *Trypanosoma brucei* is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site. *EMBO J* 10: 1061-1066.
39. Biebinger S, Helfert S, Steverding D, Ansorge I, Clayton C (2003) Impaired dimerization and trafficking of ESAG6 lacking a glycosylphosphatidylinositol anchor. *Mol Biochem Parasitol* 132: 93-96. S0166685103002172 [pii].
40. Ansorge I, Steverding D, Melville S, Hartmann C, Clayton C (1999) Transcription of 'inactive' expression sites in African trypanosomes leads to expression of multiple transferrin receptor RNAs in bloodstream forms. *Mol Biochem Parasitol* 101: 81-94.
41. Thatcher LF, Gardiner DM, Kazan K, Manners J (2011) A Highly Conserved Effector in *Fusarium oxysporum* is Required for Full Virulence on *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* .
42. Williams B, Kabbage M, Kim HJ, Britt R, Dickman MB (2011) Tipping the balance: *Sclerotinia sclerotiorum* secreted oxalic acid suppresses host defenses by manipulating the host redox environment. *PLoS Pathog* 7: e1002107.
43. Wiley M, Teygong C, Phelps E, Radke J, Blader IJ (2011) Serum response factor regulates immediate early host gene expression in *Toxoplasma gondii*-infected host cells. *PLoS ONE* 6: e18335.
44. Tarlovsky Y, Fabian M, Solomaha E, Honsa E, Olson JS et al. (2010) A *Bacillus anthracis* S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC. *J Bacteriol* 192: 3503-3511.
45. Kooter JM, Winter AJ, de OC, Wagter R, Borst P (1988) Boundaries of telomere conversion in *Trypanosoma brucei*. *Gene* 69: 1-11.

46. Hertz-Fowler C, Figueiredo LM, Quail MA, Becker M, Jackson A et al. (2008) Telomeric expression sites are highly conserved in *Trypanosoma brucei*. PLoS ONE 3: e3527.
47. Faulkner SD, Oli MW, Kieft R, Cotlin L, Widener J et al. (2006) In vitro generation of human high-density-lipoprotein-resistant *Trypanosoma brucei brucei*. Eukaryot Cell 5: 1276-1286.
48. Jackson AP, Sanders M, Berry A, McQuillan J, Aslett MA et al. (2010) The genome sequence of *Trypanosoma brucei gambiense*, causative agent of chronic human african trypanosomiasis. PLoS Negl Trop Dis 4: e658.
49. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H et al. (2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science 309: 416-422.
50. Pays E, Coquelet H, Tebabi P, Pays A, Jefferies D et al. (1990) *Trypanosoma brucei*: constitutive activity of the VSG and procyclin gene promoters. EMBO J 9: 3145-3151.
51. Carruthers VB, Navarro M, Cross GA (1996) Targeted disruption of expression site-associated gene-1 in bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol 81: 65-79.
52. Schell D, Borowy NK, Overath P (1991) Transferrin is a growth factor for the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Parasitol Res 77: 558-560.
53. Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Franco JR, Jannin JG (2011) The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. PLoS Negl Trop Dis 5: e1007.
54. Turner CM, McLellan S, Lindergard LA, Bioni L, Tait A et al. (2004) Human infectivity trait in *Trypanosoma brucei*: stability, heritability and relationship to sra expression. Parasitology 129: 445-454.

55. Hirumi H, Hirumi K (1994) Axenic culture of African trypanosome bloodstream forms. *Parasitol Today* 10: 80-84.
56. Cross GA (1984) Release and purification of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Cell Biochem* 24: 79-90.
57. Aline RF, Jr., Stuart K (1989) *Trypanosoma brucei*: conserved sequence organization 3' to telomeric variant surface glycoprotein genes. *Exp Parasitol* 68: 57-66.
58. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.

Figures

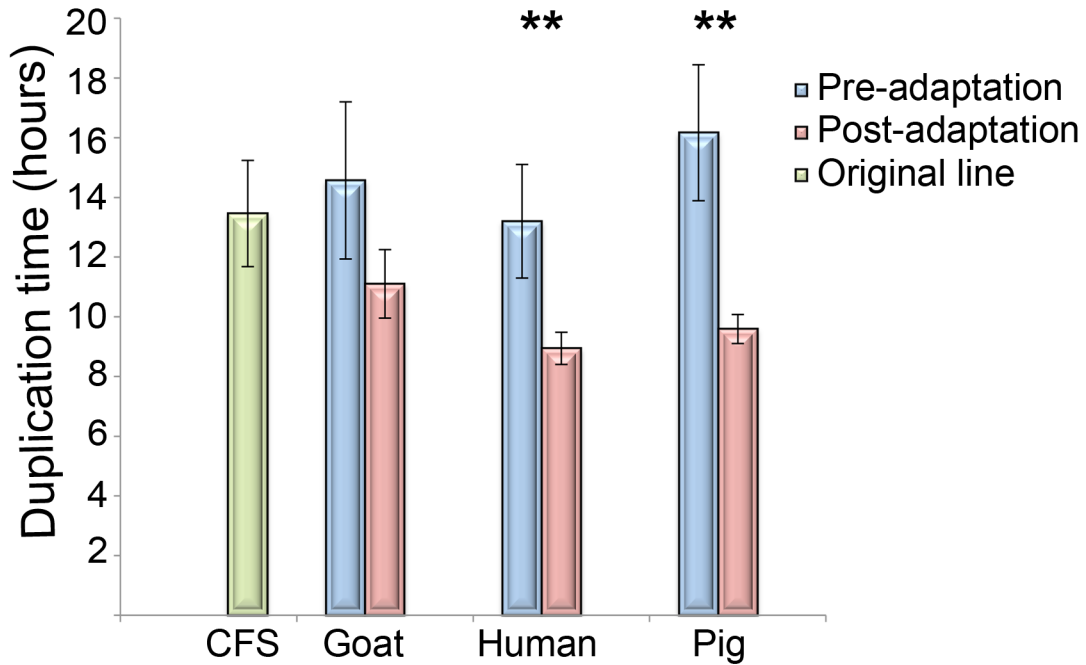


Figure 1. Duplication time of ACLs after adaptation. Histogram showing duplication time of *T. b. gambiense* (ELIANE strain) before and after 25 passages (75-105 days) in HMI9 supplemented with 20% of different mammalian sera. Mean \pm SD of at least three independent experiments is shown. Student's T test showed significant differences in human and pig ACLs between before and after adaptation (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$). ACL: adapted cell line.

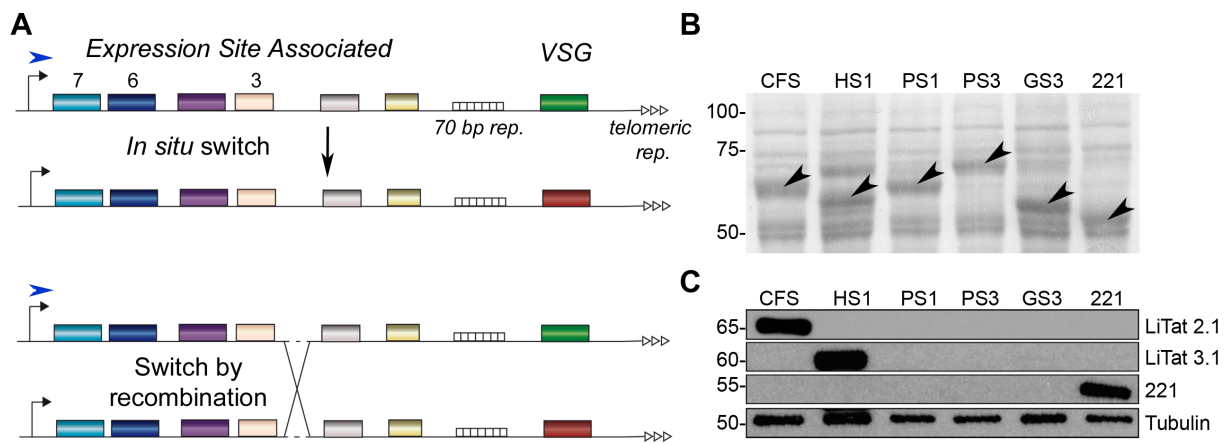


Figure 2. *VSG* expression in ACLs. (A) Schematic representation of a canonical *VSG*-Expression Site and the two main mechanisms of antigenic variation in *T. brucei* s.l. Black arrows indicate the promoter sequence and blue arrows the active transcription. The stripped boxes are the 70-base-pair repeats upstream the *VSG* gene and white triangles represent telomeric repeats. Coloured boxes denote *ESAGs* and *VSG* genes. Active *VSG*-ES can be silenced and another telomeric *VSG*-ES becomes active in an *in situ* switch (above). Alternatively recombination events in any part (or parts) of the *VSG*-ES can occur by homologous recombination, inserting new gene/s from another *VSG*-ES or non-telomeric localizations. (B) Ponceau staining of total protein extract from ACLs showing different *VSGs* (marked with an arrow). An amount equivalent to 5×10^6 parasites was loaded per well. Molecular weight is expressed in kDa. (C) WB analysis of *VSGs* expressed by different ACLs using anti-LiTat 2.1, anti-LiTat 3.1 and anti-221 antibodies [25]. Anti-Tubulin was used as loading control. Equivalent amount of 1×10^5 parasites was loaded per well. ACL: adapted cell line. CFS: calf foetal serum, GS1/2/3: goat serum (adaptation experiments 1, 2 or 3), HS1/2/3/4: human serum (adaptation experiments 1, 2, 3 or 4), PS1/2/3: pig serum (adaptation experiments 1, 2 or 3), WB: Western Blot.

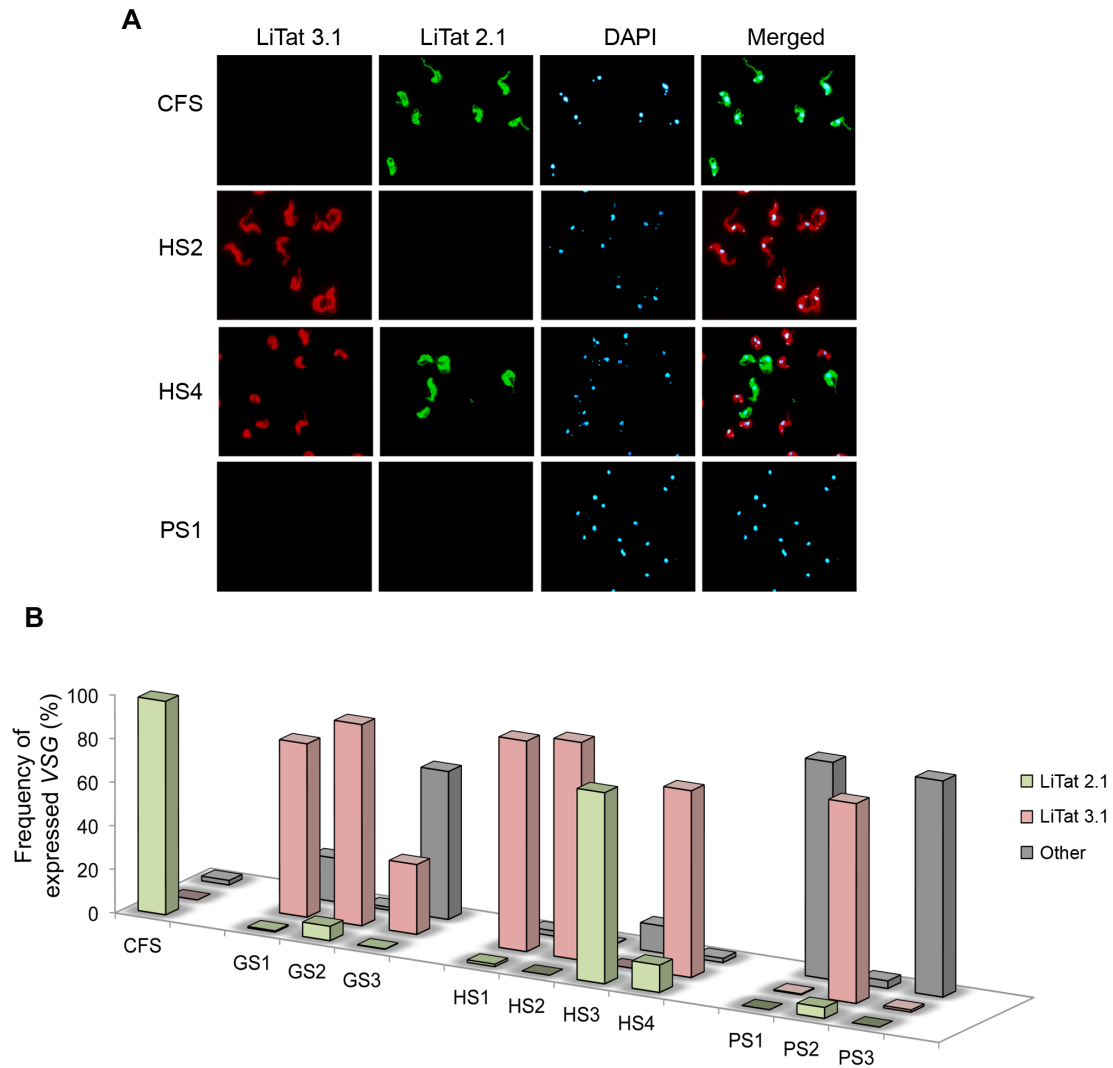


Figure 3. Antigenic variation in ACLs. (A) Immunofluorescence analysis of different *T. b. gambiense* ACLs. Monoclonal antibodies anti-LiTat 2.1 *VSG* and rabbit antiserum anti-LiTat 3.1 *VSGs* were used. (B) Frequency of expressed *VSG* (LiTat 2.1, LiTat 3.1 or other) in ACLs from goat, pig, human and calf sera. Cells were manually counted in IF ($n \approx 500$ per sample). CFS: calf foetal serum, GS1/2/3: goat serum (adaptation experiments 1, 2 or 3), HS1/2/3/4: human serum (adaptation experiments 1, 2, 3 or 4), PS1/2/3: pig serum (adaptation experiments 1, 2 or 3).

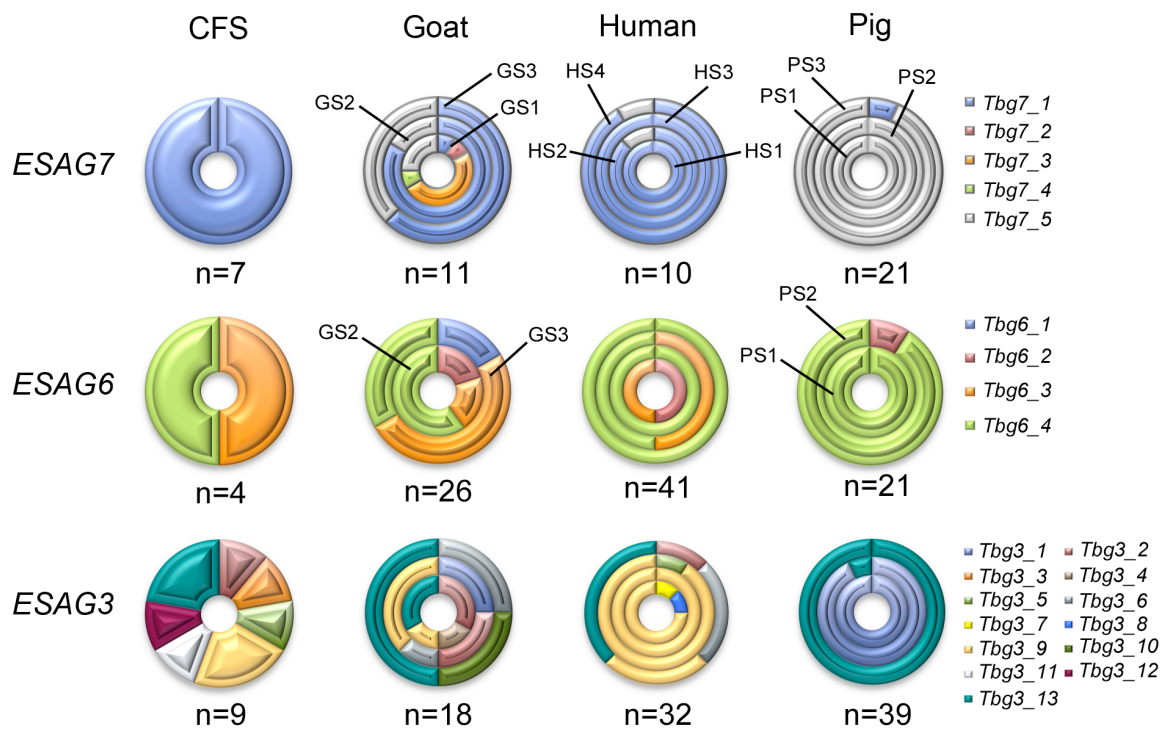


Figure 4. *ESAG* diversity in ACLs. Representation of *ESAG* genotype diversity. Unless otherwise is indicated, ACLs distribution in the graph is as indicated in *ESAG7* row. CFS: calf foetal serum, GS1/2/3: goat serum (adaptation experiments 1, 2 or 3), HS1/2/3/4: human serum (adaptation experiments 1, 2, 3 or 4), PS1/2/3: pig serum (adaptation experiments 1, 2 or 3).

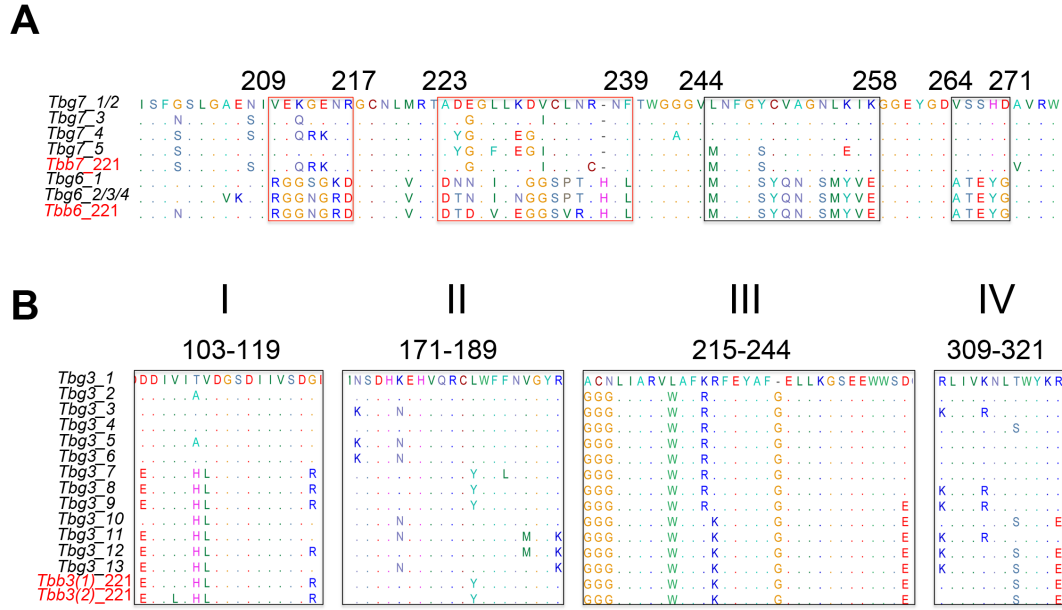


Figure 5. Alignment of transferrin binding sites (*ESAG6/7*) and polymorphic *ESAG3* regions. Amino acid alignment of polymorphic regions of *ESAG6/7* (A) and *ESAG3* (B). Transferrin binding sites are highlighted with red squares. Other polymorphic regions of *ESAG6/7* are marked with black boxes. Polymorphic regions of *ESAG3* are shown. I: S103-E119; II: L171-K189; III: A/G215-D/E244; IV: A309-R/E321. *T. b. brucei* *ESAGs* 6, 7 and 3 are shown in red.

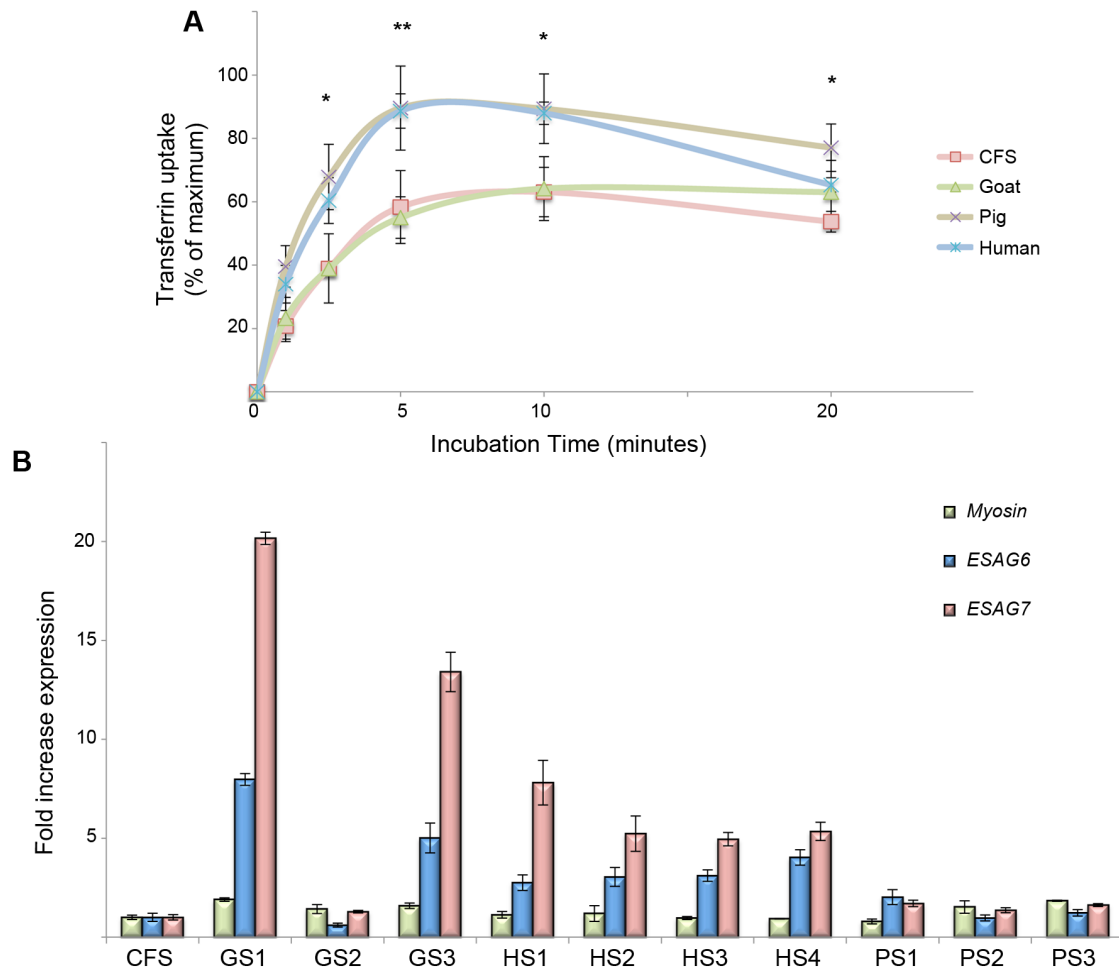


Figure 6. Transferrin uptake and mRNA *ESAG6/7* expression levels. (A) Transferrin uptake of different ACLs. Mean \pm SD of three (goat and pig) or four (human) independent experiments and three independent measures of CFS ACL are shown. Uptake is expressed as percentage of the maximum measure. One-way ANOVA test was performed (* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$). (B) Histogram showing relative expression of mRNA measured by qRT-PCR of *ESAG6* (6R) and *ESAG7* (7R) in all ACLs. Mean \pm SD of two different measures is shown. Expression values are plotted in relative expression units, calculated relative to *ATM* (*PI3Kinase*-like -Tbb927.2.2260-) expression. *Myosin* housekeeping gene is also shown [25]. ACL: adapted cell line.

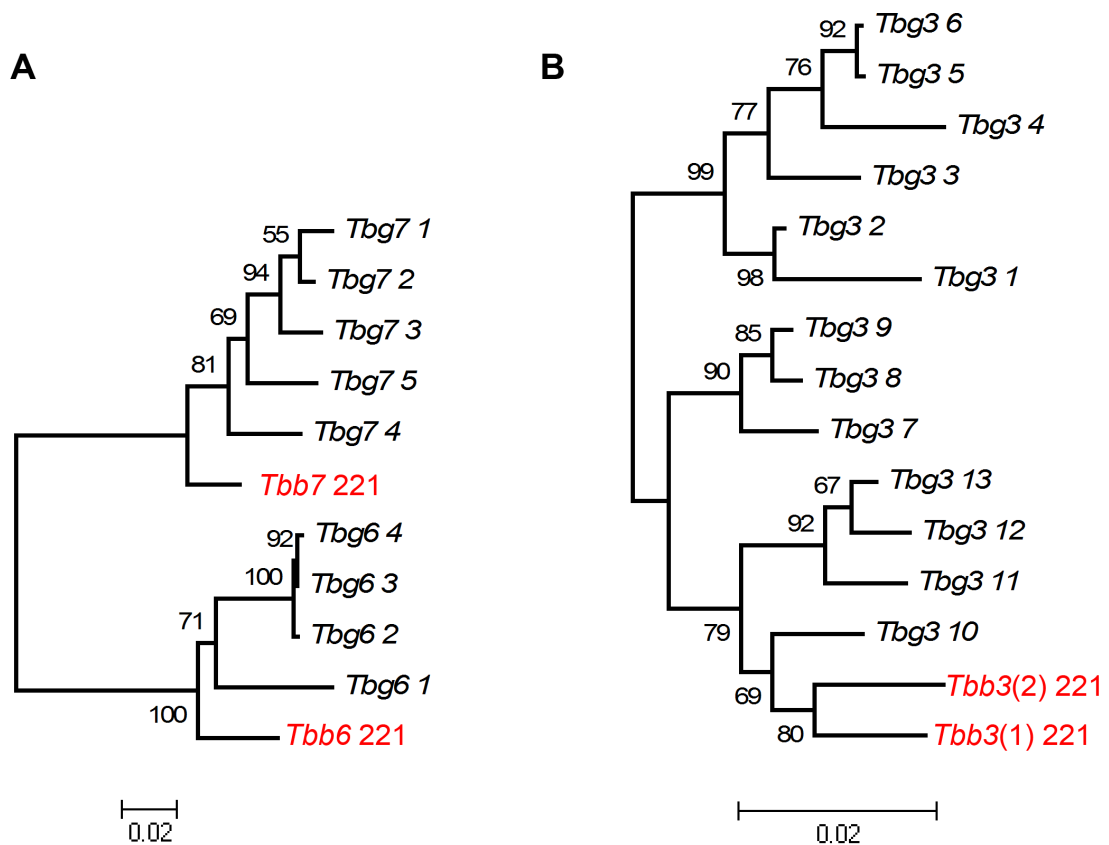


Figure S1. *ESAG3* and *ESAG6/7* clustering trees. Clustering tree of *ESAG6/7* (A) and *ESAG3* (B) genotypes found. The tree was constructed using the Neighbor-Joining method with partial ORF 673-676 bp length. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches. Distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. *T. b. brucei* *ESAGs* 6, 7 and 3 are shown in red.

Tables

Genotype	CFS	GS1	GS2	GS3	HS1	HS2	HS3	HS4	PS1	PS2	PS3	Total
<i>Tbg7_1</i>	7	1	5	5	10*	7*	11*	11*			1	58
<i>Tbg7_2</i>		1										1
<i>Tbg7_3</i>		6*										6
<i>Tbg7_4</i>		1										1
<i>Tbg7_5</i>		3	1	3		1		1	2*	4*	14*	29
<i>Tbg6_1</i>				1								1
<i>Tbg6_2</i>			1		1					1		3
<i>Tbg6_3</i>	2		1	3	1		2					9
<i>Tbg6_4</i>	2		3	2		3	2	1	10	10		33
Protein Tfr												
<i>Tbg7_1/2</i>	7	2	5	5	10	7	11	11			1	59
<i>Tbg7_3</i>		6										6
<i>Tbg7_4</i>		1										1
<i>Tbg7_5</i>		3	1	3		1		1	2	4	14	29
<i>Tbg6_1</i>				1								1
<i>Tbg6_2/3/4</i>	4		5	5	2	3	4	1	10	11		45
Total	11	12	11	14	12	11	15	13	12	15	15	141

Table 1. *ESAG6/7* genotype diversity. Summary of *ESAG6/7* genotype distribution amongst ACLs. Data represent the number of times a given genotype was obtained during genotyping analysis. Significant association between serum and genotype, assessed by Likelihood Ratio Test completed with residues analysis, is marked with an asterisk (*). For analysis, lines were grouped by serum species. Partial ORF was used for DNA genotyping (673-676 bp). Only Tfr region was used in alignments at protein level. CFS: calf foetal serum, GS1/2/3: goat serum (adaptation experiments 1, 2 or 3), HS1/2/3/4: human serum (adaptation experiments 1, 2, 3 or 4), PS1/2/3: pig serum (adaptation experiments 1, 2 or 3).

Genotype	CFS	GS1	GS2	GS3	HS1	HS2	HS3	HS4	PS1	PS2	PS3	Total
<i>Tbg3_1</i>			2						11*	13*		26
<i>Tbg3_2</i>	1	2*	2*					1				6
<i>Tbg3_3</i>	1											1
<i>Tbg3_4</i>		1										1
<i>Tbg3_5</i>	1						1					2
<i>Tbg3_6</i>			1	1				2				4
<i>Tbg3_7</i>					1							1
<i>Tbg3_8</i>					1							1
<i>Tbg3_9</i>	2	1	3		6*	5*	10*	2*				29
<i>Tbg3_10</i>				1								1
<i>Tbg3_11</i>	1											1
<i>Tbg3_12</i>	1											1
<i>Tbg3_13</i>	2	2		2				3		1*	15*	25
Protein												
<i>Tbg3_1</i>			2						11	13		26
<i>Tbg3_2</i>	1	2	2					1				6
<i>Tbg3_3</i>	1											1
<i>Tbg3_4</i>		1										1
<i>Tbg3_5</i>	1						1					2
<i>Tbg3_6</i>			1	1				2				4
<i>Tbg3_7</i>					1							1
<i>Tbg3_8</i>					1							1
<i>Tbg3_9</i>	2	1	3		6	5	10	2				29
<i>Tbg3_10</i>				1								1
<i>Tbg3_11</i>	1											1
<i>Tbg3_12</i>	1											1
<i>Tbg3_13</i>	2	2		2				3		1	15	25
Total	9	6	8	4	8	5	11	8	11	14	15	99

Table 2. *ESAG3* genotype diversity. Summary of *ESAG3* genotype distribution amongst ACLs. Data represent the number of times a given genotype was obtained during genotyping analysis. Significant association between serum and genotype, assessed by Likelihood Ratio Test completed with residues analysis, is marked with an asterisk (*). For analysis, lines were grouped by serum species. Partial ORF was used for DNA genotyping (853 bp). CFS: calf foetal serum, GS1/2/3: goat serum (adaptation experiments 1, 2 or 3), HS1/2/3/4: human serum (adaptation experiments 1, 2, 3 or 4), PS1/2/3: pig serum (adaptation experiments 1, 2 or 3).

ACL	<i>ESAG6</i> Genotype	<i>ESAG6</i> Protein	<i>ESAG7</i> Genotype	<i>ESAG7</i> Protein	<i>ESAG3</i> Genotype	<i>ESAG3</i> Protein	<i>VSG</i>
CFS	3 (50) 4 (50)	2/3/4	1	1/2	Mixed	Mixed	2.1
GS1	ND	ND	3 (50)	3 (50)	Mixed	Mixed	3.1
GS2	3 (60)	2/3/4	1 (83.3)	1/2 (83.3)	Mixed	Mixed	3.1
GS3	3 (50)	2/3/4 (83.3)	1 (62.5)	1/2 (62.5)	Mixed	Mixed	ND_1
HS1	2 (50) 3 (50)	2/3/4	1	1/2	9 (75)	9 (75)	3.1
HS2	4	2/3/4	1 (87.5)	1/2 (87.5)	9	9	3.1
HS3	3 (50) 4 (50)	2/3/4	1	1/2	9 (90.9)	9 (90.9)	2.1
HS4	4	2/3/4	1 (91.7)	1/2 (91.7)	Mixed	Mixed	3.1
PS1	4	2/3/4	5	5	1	1	ND_2
PS2	4	2/3/4	5	5	1 (92.8)	1 (92.8)	3.1
PS3	ND	ND	5 (93.3)	5 (93.3)	13	13	ND_3

Table S1. Summary of *ESAG6/7*, *ESAG3* and *VSG* expressed by all ACLs. Numbers represent the main genotype found in each ACL (see Tables 1 and 2 for further information). Frequency of the main genotype is given in parenthesis. If no number is shown, only the specified genotype was observed. Mixed: population contains more than 3 genotypes with no dominants. CFS: calf foetal serum, GS1/2/3: goat serum (adaptation experiments 1, 2 or 3), HS1/2/3/4: human serum (adaptation experiments 1, 2, 3 or 4), PS1/2/3: pig serum (adaptation experiments 1, 2 or 3). ACL: adapted cell line.

