

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE INFORMACIÓN
GEOGRÁFICA AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DE
LA TRIPANOSOMIAS AFRICANA EN LOS FOCOS DE
KOGO Y MBINI, GUINEA ECUATORIAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Jorge Cano Ortega

Bajo la dirección de los doctores
Agustín Benito Llanes y Jesús Roche Royo

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-1062-8**

© Jorge Cano Ortega, 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE INFORMACIÓN
GEOGRÁFICA AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DE
LA TRIPANOSOMIASIS AFRICANA EN LOS FOCOS DE
KOGO Y MBINI, GUINEA ECUATORIAL**



Jorge Cano Ortega
Madrid, abril 2008

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE INFORMACIÓN
GEOGRÁFICA AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DE
LA TRIPANOSOMIASIS AFRICANA EN LOS FOCOS DE
KOGO Y MBINI, GUINEA ECUATORIAL**

Memoria presentada por Jorge Cano Ortega
Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Dirigida por los Doctores:

Dr. Agustín Benito Llanes

Dr. Jesús Roche Royo

D. Agustín Benito Llanes, Doctor en Biología y Jefe de Servicio de Medicina Tropical del Centro Nacional de Medicina Tropical y **D. Jesús Roche Royo**, Doctor en Medicina y Cirugía y Jefe de Servicio de Sanidad Exterior.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: "*Aplicación de los Sistemas de Información Geográfica al estudio de la transmisión de la tripanosomiasis africana en los focos de Kogo y Mbinj, Guinea Ecuatorial*" presentado por el Licenciado en Ciencias Biológicas D. Jorge Cano Ortega, ha sido realizado bajo su dirección, cumpliendo las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Madrid, abril de 2008

Vº Bº Directores

Dr. D. AGUSTÍN BENITO LLANES

Dr. D. JESÚS ROCHE ROYO

El interesado

D. JORGE CANO ORTEGA

A mis padres
A mí siempre querida Gina

AGRADECIMIENTOS

Son muchos a los que debo agradecer su apoyo, moral y profesional, en la realización de este trabajo científico. Intentar citarles a todos, con seguridad, me llevaría a cometer el error imperdonable de omitir a alguno, o en el mejor de los casos, a prolongar los agradecimientos más allá de lo razonable.

Me limitaré a expresar mi más profundo agradecimiento a todos aquellos que me acompañaron de una u otra forma durante estos años de trabajo, tanto en Guinea Ecuatorial, como en España.

A mi familia, por haber soportado con abnegada entrega y paciencia mis ausencias y desvaríos profesionales, las semanas de trabajo de campo en los bosques de Kogo y Mbini, mis enfermedades y frustraciones...

A los compañeros, ecuatoguineanos y españoles, con los que he tenido el gran privilegio de compartir estos años de trabajo en Guinea Ecuatorial. A mis colegas del Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis y de la Dirección General de Salud Pública y Planificación Sanitaria, del Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de Guinea Ecuatorial.

Al equipo técnico del Centro Nacional de Medicina Tropical (Instituto de Salud Carlos III), y a los colegas del Centro de Malaria e Outras Doenças Tropicais (Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa).

Un recuerdo especial al Profesor Dr. Ignacio Garcia Más y su equipo docente de Parasitología (Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid), por contagiarme su pasión por la parasitología y la medicina tropical.

Y finalmente, mi más profundo agradecimiento a Nicolás Ndong Mabale y Miguel Angel Descalzo Gallego, protagonistas indiscutibles y copartícipes de este trabajo.

El trabajo de campo se ha llevado a cabo gracias a la financiación de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo, en el marco de las actividades de control y prevención de la Tripanosomiasis Humana Africana desarrolladas en el Proyecto Centro de Referencia para el Control de Endemias en Guinea Ecuatorial (Centro Nacional de Medicina Tropical – Fundación para la Cooperación y Salud Internacional, Instituto de Salud Carlos III).

0. INDICE

I. INTRODUCCION	1
1. TRIPANOSOMAS. GENERALIDADES	1
2. TRIPANOSOMIASIS ANIMAL AFRICANA (TAA)	4
2.1. GENERALIDADES	4
2.2. ETIOLOGÍA Y CLÍNICA	5
2.3. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	7
2.4. DIAGNÓSTICO	12
2.5. PREVENCIÓN Y CONTROL	13
3. TRIPANOSOMIASIS HUMANA AFRICANA (THA)	15
3.1. GENERALIDADES	15
3.2. ETIOLOGÍA Y CLÍNICA	17
3.3. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	19
3.4. DIAGNÓSTICO	22
3.5. PREVENCIÓN Y CONTROL	23
4. TRIPANOSOMIASIS EN LA REPÚBLICA DE GUINEA ECUATORIAL	26
4.1. GENERALIDADES	26
4.2. EPIDEMIOLOGÍA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	27
4.3. DIAGNÓSTICO	26
4.4. PREVENCIÓN Y CONTROL	29
5. APLICACIÓN DE LOS SISTEMAS DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA (SIG) AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DE LA TRIPANOSOMIASIS	33
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS	36
III. MATERIAL Y METODOS	38
1. ÁREA DE ESTUDIO	38
1.1. FOCO DE KOGO	41
1.2. FOCO DE MBINI	43

	Indice
2. CAPTURAS Y CONTROL DE MOSCA TSETSE	45
3. PROCESAMIENTO DE LAS MOSCAS TSETSE	47
4. INDICADORES ENTOMOLÓGICOS	50
5. INFECCIÓN POR <i>TRYPANOSOMA SP</i> EN GANADO PERIDOMÉSTICO	50
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
7. ANÁLISIS ESPACIAL	53
IV. RESULTADOS	55
1. VARIABILIDAD ESPACIAL Y TEMPORAL DE LAS POBLACIONES DE <i>GLOSSINA PALPALIS PALPALIS</i> EN EL FOCO DE MBINI (GUINEA ECUATORIAL)	56
2. PREDICCIÓN DE LA DISTRIBUCIÓN Y DISPERSIÓN DE <i>GLOSSINA PALPALIS PALPALIS</i> (DIPTERA: GLOSSINIDAE) EN LA ESTACIÓN LLUVIOSA Y SECA EN EL FOCO DE TRIPANOSOMIASIS DE KOGO (GUINEA ECUATORIAL)	77
3. ALTA INFECCIÓN POR <i>TRYPANOSOMA SP</i> EN GANADO PERIDOMÉSTICO Y RELACIÓN CON LA DENSIDAD APARENTE DE MOSCA TSETSE EN DOS FOCOS ENDÉMICOS DE GUINEA ECUATORIAL	98
V. DISCUSION GENERAL	116
VI. CONCLUSIONES	129
VII. BIBLIOGRAFÍA	133

TABLAS E ILUSTRACIONES

Tablas

Tabla 1. Comparación de la tripanosomiasis gambiense y rhodesiense	17
Tabla 2. Nuevos casos registrados entre 1997 y 2006	22
Tabla 3. PCR para detección de <i>Trypanosoma</i> sp y secuencias de iniciadores	52

Figuras

Figura 1. Distribución geográfica de la mosca tsetse	11
Figura 2. Distribución geográfica y endemicidad	16
Figura 3. Distribución geográfica de los focos de gambiense y rhodesiense	21
Figura 4. Situación geográfica de los focos de tripanosomiasis en Guinea Ecuatorial	27
Figura 5. Evolución de los casos detectados en Guinea Ecuatorial (1985-2006)	25
Figura 6. Protocolo de despistaje de casos del PNCTHA, Guinea Ecuatorial.....	28
Figura 7. Mapa y situación de la República de Guinea Ecuatorial.....	38
Figura 8. Distribución de los poblados y secaderos en el foco de Kogo.....	42
Figura 9. Distribución de los poblados y secaderos en el foco de Mbini	44

Fotografías

Foto 1. Trampa piramidal localizada en las proximidades de un pozo	30
Foto 2. Pantalla impregnada con deltametrina en zona ribereña.....	32
Foto 3. Praderas naturales costeras.....	39
Foto 4. Manglar ribereño	40
Foto 5. Secadero de pescado (Ndjonmelen).....	43
Foto 6. Trampa piramidal en un punto de recogida de agua (Mbini)	45
Foto 7. Trampa piramidal en un secadero de pescado (Kogo)	46
Foto 8. <i>Glossina</i> sp posada en una trampa piramidal.....	46

Foto 9. Botella recolectora con solución formol al 5%..... 47

Foto 10. Recuento de glossinas en el terreno 48

Foto 11. Determinación de especie y sexo, y estudio de las lesiones alares 49

Foto 12. Ejemplares de *Glossina palpalis palpalis* (hembras jóvenes) 49

I. INTRODUCCION

1. Tripanosomas. Generalidades

Los representantes del género *Trypanosoma* Gruby, 1843 viven en la sangre y a veces en otros tejidos de sus hospedadores vertebrados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) y son transmitidos por vectores hematófagos (sanguijuelas para los hospedadores acuáticos e insectos para los terrestres). Excepcionalmente, algunos tripanosomas han prescindido -evolutivamente- del vector.

La posición sistemática de los tripanosomas es la siguiente ([Levine y col., 1980](#)):

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Suborden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Genero	<i>Leptomonas</i> Kent, 1880
	<i>Herpetomonas</i> Kent, 1880
	<i>Crithidia</i> Léger, 1902
	<i>Blastocrithidia</i> Laird, 1909
	<i>Phytomonas</i> Donovan, 1908
	<i>Leishmania</i> Ross, 1903
	<i>Endotrypanum</i> Mesnil & Brimont, 1908
	<i>Trypanosoma</i> Gruby, 1843

El Orden Kinetoplastida es un grupo cosmopolita de protozoos flagelados que parasitan virtualmente a cada grupo de organismos eucariotas, incluyendo a otros protozoarios. Se caracterizan por presentar 1 ó 2 flagelos que se originan de una abertura llamada bolsa flagelar. Contienen una estructura prominente llamada *quinetoplasto* o *cinetoplasto*, que corresponde a una condensación de ácido desoxiribonucleico (en adelante ADN) localizado en el interior de una única mitocondria que está ramificada por todo el cuerpo del parásito. Este *quinetoplasto* se sitúa próximo al cuerpo basal del flagelo. Otras estructuras características de estos organismos son las organelas especializadas tipo peroxisomas, conocidos como *glicosomas*, y la presencia de microtúbulos subpeliculares.

Los primeros cuatro géneros de la familia Trypanosomatidae son parásitos **monogénéticos** (tienen un solo huésped en su ciclo biológico) de animales invertebrados (especialmente insectos). Los cuatro últimos, en cambio, son parásitos **digenéticos**, el ciclo de vida alterna entre dos huéspedes: un invertebrado, que generalmente representa al vector, y un animal vertebrado, en el caso de los géneros *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Trypanosoma*, y ciertas especies de plantas, en el caso del género *Phytomonas* ([Sánchez-Moreno y col., 1998](#)).

Según el desarrollo del ciclo biológico en el vector, el género *Trypanosoma* se ha dividido en dos grupos. El primero, llamado **Stercoraria**, incluye los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, progresando en el sentido de la porción intestinal (digestivo posterior) con liberación de las formas infectivas junto con las heces. En este grupo tenemos a *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma lewisi*. El segundo grupo, llamado **Salivaria**, incluye tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo anterior y que posteriormente atraviesan el epitelio digestivo llegando a las glándulas salivales. Las formas infectivas serán pues, inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma rangeli*, entre otras.

Como ejemplo de transmisión en la que no se conoce vector y se transmite durante la cópula está *Trypanosoma equiperdum*, causante en los caballos de una patología denominada "durina".

En el hospedador vertebrado, la mayoría de los tripanosomas se dividen, en alguna de sus formas (*tripomastigote*), por división binaria, y son transmitidos por el vector (insectos hematófagos) de un vertebrado a otro.

Estos tripanosomas se distribuyen en cuatro subgéneros que a su vez se incluyen en tres grupos. Algunos de estos grupos son, a su vez, incluidos dentro de varios subgrupos según ciertas características morfológicas y biológicas.

1. Subgénero *Duttonella* Chalmer, 1918. **Grupo Vivax:** son tripanosomas monomorfos, poseen un flagelo libre, redondeados en la parte posterior, quinetoplasto grande y terminal. Se desarrolla exclusivamente en la probóscide del vector. Ejemplo: *Trypanosoma vivax*.
2. Subgénero *Nannomonas* Hoare, 1964. **Grupo Congolense:** formas pequeñas, no poseen flagelo libre, quinetoplasto de tamaño medio y marginal. Se desarrolla en el intestino medio y en la probóscide del vector (*Glossina* sp, Diptera: Glossinidae). Ejemplo: *T. congolense*.
3. Subgénero *Trypanozoon* Lühe, 1906. **Grupo Brucei, subgrupos Brucei y Evansi:** poseen pleomorfismo (varias formas); formas delgada, intermedia y rechoncha, con o sin flagelo libre, quinetoplasto pequeño y subterminal (invisible en *T. equiperdum*). *Trypanosoma brucei* se desarrolla en el intestino medio y en las glándulas salivales del vector (*Glossina* sp, Diptera: Glossinidae).

En el vector, *Trypanosoma brucei* sufre una serie de transformaciones y divisiones, pasando de la forma corta de tripomastigote procíclico (*stumpy*) a la forma alargada o promastigote (*slender*). En esta forma el parásito se divide por fisión binaria para transformarse, posteriormente, en epimastigote. Este, atraviesa el epitelio digestivo y pasa a las glándulas salivales, donde se transforma en tripomastigote metacíclico o infectivo.

Otras especies son transmitidas mecánicamente sin desarrollarse en vectores (*Trypanosoma evansi*) o por contacto entre hospedadores mamíferos (*T. equiperdum*).

4. Subgénero *Pycnomonas* Hoare, 1964. **Grupo Brucei, subgrupo Suis:** formas gruesas (monomórficas) con un flagelo libre y corto, quinetoplasto pequeño y subterminal. Se desarrolla en el intestino medio y glándulas salivales del vector (*Glossina* sp, Diptera: Glossinidae). *Trypanosoma suis* es la única especie dentro de este subgénero.

Algunas especies no producen -o no parecen producir- patología a sus hospedadores, pero otras son responsables de un conjunto de afecciones a humanos y otros mamíferos

conocidas globalmente con el nombre de **tripanosomiasis o tripanosomosis**.

De todas las especies existentes, las mejor conocidas y más interesantes son las que parasitan a los mamíferos: *Trypanosoma brucei brucei*, *T. vivax* y *T. congolense* (formas forest, savannah y ilifi), causantes del "nagana" en rumiantes y carnívoros de África tropical y subtropical; *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, causantes de la "enfermedad del sueño" en los humanos en África (**Tripanosomiasis humana africana**); *Trypanosoma cruzi*, causa del "mal de Chagas" en humanos en América (**Tripanosomiasis humana americana**); *Trypanosoma equinum*, productor del "mal de caderas" en équidos de América y *T. equiperdum*, causante de la enfermedad conocida como "durina" en équidos de la región mediterránea, India y América.

T. evansi, de distribución cosmopolita, infecta a una gran variedad de grandes mamíferos entre los que se incluyen caballos, camellos, búfalos, venados y ganado, causando la enfermedad conocida como "Surra", responsable de importantes pérdidas económicas en África, Asia y Sudamérica ([Brun y col., 1998](#)). Recientemente, se ha descrito en la India un caso de infección por *T. evansi* en humanos, probablemente por contacto con sangre de un animal infectado ([Joshi y col., 2005](#)).

2. Tripanosomiasis Animal Africana (TAA)

2.1. Generalidades

La Tripanosomiasis Animal Africana (en adelante TAA), conocida vulgarmente como "nagana", representa uno de los principales problemas para el desarrollo de los países del África subsahariana. La mosca tsetse (*Glossina* sp, Diptera: Glossinidae), responsable de la transmisión de la tripanosomiasis, se distribuye en una superficie total de 10 millones de km², y se estima que un 30% del ganado africano está en riesgo de infección ([Geerts y Holmes, 1998](#); [Van de Bossche y Chigoma, 2001](#)).

T. b. brucei, *T. congolense*, *T. evansi* y *T. vivax* son los responsables de la infección en bovinos, equinos y pequeños rumiantes, y *T. simiae* en cerdos. *T. simiae* y *T. vivax* pueden también transmitirse de forma mecánica por tabánidos (Diptera: Tabanidae) y otros insectos hematófagos. *T. evansi* es transmitido mecánicamente por la mosca tsetse (*Glossina* sp, Diptera: Glossinidae), y afecta principalmente a los camellos ([Brun](#)

[y col., 1998](#)), aunque puede parasitar a otros mamíferos domésticos como cabras y ovejas ([Boyd y col., 1981](#)).

2.2. Etiología y Clínica

La infección en el ganado bovino por estos tripanosomas produce una enfermedad subaguda, aguda o crónica que se caracteriza por una fiebre intermitente, anemia, diarrea y pérdida rápida de condición, que con frecuencia termina causando la muerte del animal.

Aunque todos ellos provocan el debilitamiento del animal debido a la anemia, la patología en la infección por *T. brucei* está más asociada con la degeneración e inflamación de tejidos con afectación, en muchos casos, del sistema nervioso central.

Como las infecciones simultáneas con más de una especie de tripanosoma ([Makumyaviri y col., 1989](#); [Jamonneau y col., 2004](#)) y con otros hemoparásitos (*Babesia* spp, *Teileria* spp, *Anaplasma* spp y *Ehrlichia* spp) son bastante comunes, resulta difícil asociar los signos clínicos a la infección por una u otra especie. Se han realizado pocos estudios adecuadamente controlados, por lo que no ha sido posible, hasta la fecha, reconstruir la respuesta clínica específica para cada tripanosoma.

Lo que sigue a continuación es una suma de síndromes observados en el terreno y en casos experimentales de "nagana".

El signo clínico cardinal observado en la infección animal por tripanosoma es la anemia. En las fases iniciales de la infección, cuando los niveles de parasitemia son altos, esta infección parece estar relacionada directamente con los tripanosomas, posiblemente causada por una hemolisina del parásito. En las fases posteriores de la infección, después de que desaparecen los tripanosomas de la circulación periférica, la destrucción eritrocítica es principalmente por eritrofagocitosis. El estímulo para esta destrucción eritrocítica tardía es aún desconocida. También aparece fiebre intermitente, edema y laxitud o pérdida de condición. La severidad de la respuesta clínica depende de la especie animal, de la especie de tripanosoma, del estado nutricional del animal afectado y de la virulencia del tripanosoma (genotipo) infectante. Se ha observado que el estrés juega un papel determinante en la evolución de la enfermedad y en la gravedad de las manifestaciones clínicas ([Goossens y col., 1999](#)).

En las fases terminales de la enfermedad causada por tripanosomas hemáticos, se

observa la poliencfalomalasia focal, probablemente causada por la isquemia que resulta de la acumulación masiva de parásitos en los capilares terminales del encéfalo. La acumulación de estos parásitos en los capilares somáticos también es observada en el corazón y en músculo esquelético.

La marcada inmunosupresión que resulta de la infección por tripanosomas, permite la instauración de otras patologías infecciosas, dando como resultado infecciones secundarias que complican los factores clínicos y patológicos del "nagana".

T. congolense es un tripanosoma hemático que se encuentra sólo en los vasos sanguíneos de los animales que infecta. No se localiza o multiplica fuera ellos. La infección por *T. congolense* puede derivar en una enfermedad sobreaguda, aguda o crónica en ganado bovino, ovejas, cabras y equinos. Los cerdos muestran, en ocasiones, la enfermedad más leve y en los perros es común la forma crónica ([Horchner y col., 1985](#); [Reinfenberg y col., 1997](#)).

Al periodo de incubación, que puede variar de 4 a 24 días, le siguen episodios febriles intermitentes, depresión, letargia, debilidad, pérdida de condición, anemia, salivación, lagrimeo y descarga nasal. Conforme progresa la enfermedad, hay una pérdida de condición y el pelo de color negro puede cambiar a marrón metálico. El lomo con frecuencia se observa arqueado y el abdomen recogido, pulso acelerado e insuficiencia respiratoria como consecuencia de la anemia. El microorganismo se observa fácilmente en frotis sanguíneos, especialmente en la fase inicial de la enfermedad. En las formas más crónicas de la enfermedad, los ganglios linfáticos están aumentados y es posible detectar los parásitos en frotis del contenido de dichos ganglios.

T. vivax tiene un periodo de incubación variable (de 4 a 40 días) y es considerado menos virulento para el ganado que *T. congolense*. Parece haber una variación marcada en la virulencia con diferentes cepas de *T. vivax* ([Leeflang y col., 1976](#); [Joshua, 1988](#)), pero sigue siendo la causa más importante del nagana en bóvidos y ovejas de África Occidental. En caballos la enfermedad no es grave y es crónica en perros. Resulta difícil encontrar *T. vivax* en frotis sanguíneo, pero no así en frotis del contenido de ganglios linfáticos.

T. b. brucei tiene un periodo relativamente corto de incubación (de 5 a 10 días) y causa una infección severa, y fatal en la mayoría de los casos, en equinos, perros y gatos. Generalmente, causa una enfermedad leve, crónica o subclínica en ganado bovino, ovejas, cabras y cerdos. Se da una respuesta febril en caballos de 4 a 14 días

después de la infección y ésta es seguida por reacciones febriles recurrentes. Las frecuencias cardíaca y respiratoria se elevan notablemente, y se puede observar pérdida de condición y debilidad mientras el apetito se mantiene. La anemia progresiva, la ictericia y el edema de la región ventral, especialmente en los genitales del macho, son característicos. El parásito no siempre se observa fácilmente en frotis sanguíneo, en cambio sí se detectan en frotis de tejidos o en cortes de ganglios linfáticos. Los animales infectados mueren en pocas semanas o meses, dependiendo de la virulencia de la cepa de *T. b. brucei*.

2.3. Epidemiología y Distribución geográfica

Fue el misionero y explorador escocés David Livingston (1813-1875), el primero en sugerir que el "nagana" estaba causado por la picadura de la mosca tsetsé. En 1852, este explorador informó sobre la presencia de la enfermedad en los valles de los ríos Limpopo y Zambeze, así como en las orillas del lago Tanganyika y Nyasa. Sin embargo, tuvieron que pasar 40-50 años hasta que se identificó al tripanosoma como agente causal del "nagana" y de la enfermedad del sueño ([Steverding 2008](#)). En 1895, Sir David Bruce (1855-1931) identificó a los tripanosomas como la causa de la enfermedad que afectaba al ganado bovino del poblado de Ubombo, en el norte de la región de Kwa-Zulu, y a la mosca tsetsé (*Glossina* sp, Diptera: Glossinidae) como el responsable de la transmisión ([Joubert y col., 1993](#)). La enfermedad se extendía en África Oriental y África del Sur, donde fue reconocida por vez primera, hasta que una pandemia de peste bovina de 1890 y 1898 diezmó la población doméstica y silvestre de rumiantes. La eliminación masiva del antílope, principal reservorio de los tripanosomas y fuente principal de alimento para el vector *Glossina pallidipes*, como consecuencia de la pandemia de peste bovina, tuvo como resultado una notable reducción del área afectada. El establecimiento de leyes de protección hizo posible que los rumiantes silvestres volvieran a poblar la zona, favoreciéndose la reinstalación del "nagana".

En el continente africano, el crecimiento y desarrollo de los animales se ve afectado de manera significativa como consecuencia de estas infecciones: disminución de la densidad de ganado de 37-70%, una reducción del 50% en la producción de carne y leche ([Swallow, 2000](#)), y grandes áreas de terreno sin explotar, comprometiendo la producción ganadera y agrícola en estos países ([Murray y col., 1991](#); [Winrock International, 1992](#); [OMS, 1998](#)). Para minimizar estas pérdidas dramáticas, se han llevado a cabo numerosas tentativas de erradicación del vector.

Transmisión

Los vectores biológicos más importantes del "nagana" en animales, y de la enfermedad del sueño en el hombre, son moscas del género *Glossina* (Diptera: Glossinidae) o mosca tsetse. Existen más de veinte especies vectoras y todas ellas habitan en el continente africano. Sólo una, *Glossina tachinoides*, está presente en otras regiones (sur de la península arábiga).

La transmisión de la tripanosomiasis por *T. vivax* y *T. simiae* también puede ser mecánica, por la mosca tsetse y otras moscas hematófagas. Entre los vectores mecánicos más importantes se encuentran las moscas del género *Tabanus* (Diptera: Tabanidae), aunque también se han incriminado a especies de los géneros *Haematopota*, *Liperosia*, *Stomoxys* y *Chrysops*.

Clasificación actual de las moscas tsetse

Las moscas tsetse son insectos pertenecientes al orden **Diptera**, suborden **Cyclorhapha**, así llamado porque los adultos emergen de una exuvia ninfal mediante rasgado circular. La espina, saco inflable que las jóvenes moscas tsetse levantan sobre sus antenas para rasgar la exuvia ninfal, deja una sutura permanente cuando se extrae, por lo que se clasifican dentro de la serie **Schizophora**.

Pertenecen a la superfamilia **Muscidae**, cuyos miembros se caracterizan por tener:

- Antena con un tercer segmento desarrollado que cuelga.
- Una vena anal que desaparece antes de que alcance el borde alar.
- Un gran y redondeado calípter inferior.

Dentro de esta superfamilia, la familia **Glossinidae** se distingue por un conjunto de caracteres morfológicos de los que cabe destacar:

- El aparato bucal muestra la base del labio prominente (hinchado), como un bulbo flanqueado por dos palpos maxilares rasurados que protegen y cubren la probóscide cuando no está en uso. Cuando van a alimentarse la probóscide, que es una estructura perforante, se dispone por debajo de los palpos maxilares.
- Célula discal del ala en forma de "hacha" (muy característico).
- Un gran número de pelos plumosos en la parte superior de la arista.

La larviparidad (vivíparas) y el hecho de que tanto machos como hembras se alimenten de sangre, son dos caracteres distintivos en la biología de la mosca tsetsé. El proceso completo de desarrollo larváreo tiene lugar en el útero de la hembra, la cual deposita la larva en el suelo (terreno arenosos y poco compactos) donde rápidamente pasa al estado ninfal (pupa) sin alimentarse.

Las moscas tsetsé se dividen en tres subgéneros, más comúnmente conocidos como grupos de acuerdo a sus caracteres ecológicos y morfológicos:

1. Subgénero *Nemorhina* (Robineau-Desvoidy, 1830) o **grupo palpalis**, incluye 9 especies y subespecies.

Las moscas de este grupo se encuentran normalmente a lo largo de cursos de agua de la costa Atlántica (África Occidental) y en el Alto Nilo, en Etiopía y Uganda. Suelen vivir en la vegetación circundante a las orillas de los ríos. Se encuentran en las zonas de transición del bosque, e incluso dentro de zonas de bosque denso, alrededor de lagos, manglares y "niayes" (depresiones formadas entre dunas costeras) de Senegal. Algunas especies colonizan zonas de vegetación frecuentada por el hombre, en focos peridomésticos.

Las especies de este grupo desempeñan un papel importante en la transmisión de la tripanosomiasis africana, tanto humana como animal.

- | | |
|---|--|
| <i>G. caliginea</i> (Austen, 1911) | <i>G. pallicera newsteadi</i> (Austen, 1929) |
| <i>G. fuscipes fuscipes</i> (Newstead, 1910) | <i>G. pallicera pallicera</i> (Bigot, 1891) |
| <i>G. fuscipes martinii</i> (Zumpt, 1935) | <i>G. palpalis gambiense</i> (Vanderplank, 1949) |
| <i>G. fuscipes quanzensis</i> (Pires, 1948) | <i>G. tachinoides</i> (Westwood, 1850) |
| <i>G. palpalis palpalis</i> (Robineau-Desvoidy, 1830) | |

2. Subgénero *Glossina* s.s. (Zumpt, 1935) o **grupo morsitans**, incluye 7 especies y subespecies.

Las moscas de este grupo prefieren vivir en bosques de sabana o matorral denso. También es posible encontrarlas en bosques abiertos. Unas pocas especies pueden sobrevivir indistintamente en pasto seco o en bosque húmedo. Su presencia está asociada con el ganado, doméstico y silvestre, y son decisivos en la transmisión de la

tripanosomiasis animal.

G. austeni (Newstead, 1912)

G. morsitans morsitans (Westwood, 1850)

G. longipalpis (Wiedemann, 1830)

G. morsitans centralis (Machado, 1970)

G. pallidipes (Austen, 1903)

G. palpalis gambiense (Vanderplank, 1949)

G. morsitans submorsitans (Newstead, 1910)

3. Subgénero *Austenina* (Townsend, 1921) o **grupo fusca**, incluye 15 especies y subespecies.

La mayoría viven en áreas de bosque; bosque lluvioso, mesófilo, mosaico sabana-bosque, bosque secundario y galerías forestales densas.

Algunas especies son excepcionales vectores de la tripanosomiasis animal y ocupan áreas extensas que acaban siendo inhabilitadas como pastos. Tienden a retirarse de los bosques que son deforestados o aquellos donde la actividad predatoria sobre huéspedes salvajes potenciales es intensa.

G. frezili (Gouteux, 1988)

G. haningtoni (Newstead y Evans, 1922)

G. brevipalpis (Newstead, 1910)

G. longipennis (Corti, 1895)

G. fusca fusca (Walter, 1849)

G. medicorum (Austen, 1911)

G. fuscipleuris (Austen, 1911)

G. nashi (Potts, 1955)

G. schwetzi (Newstead y Evans, 1921)

G. severini (Newstead, 1913)

G. vanhoofi (Henrard, 1952)

G. nigrofusca hopkinsi (Van Emden, 1944)

G. tabaniformis (Westwood, 1850)

G. nigrofusca nigrofusca (Newstead, 1910)

G. fusca congolensis (Newstead y Evans, 1921)

Comportamiento y hábitos de vida de las moscas tsetse

La mosca tsetse invierte, aproximadamente, hora y media al día en el vuelo. El resto del tiempo se encuentra reposando en lugares húmedos y sombreados protegidos del

calor, la insolación y el viento. Se piensa que las moscas tsetsé son principalmente diurnas, aunque algunas especies se sabe que son activas al atardecer e incluso durante la noche.

Su vuelo es característico; bajo (menos de medio metro del suelo) y rápido (5 m/seg). Hace cortos vuelos intercalados con periodos de descanso. En vuelo, buscan contactar con rastros de olor que le lleven a la fuente de alimento. El sentido del olfato, que es parcialmente conocido en ciertas especies, se asocia con la vista que, a distancias cortas, permite dirigir el vuelo en busca de huéspedes de los que alimentarse.

Distribución geográfica

Casi dos terceras partes de África tropical y subtropical (un área de casi 8 millones de Km²) están infectadas por la mosca tsetsé y por "nagana" (**Figura 1**). Esta región se extiende desde el sur del Sahara (15° latitud norte) hasta Angola, Zimbabwe y Mozambique en el sur (20° latitud sur), abarcando a 38 países africanos. Una gran parte de esta vasta zona se considera inhabitable para el ser humano y para la producción de ganado.



Figura 1. Distribución geográfica de la mosca tsetsé

En Sudáfrica se logró erradicar el vector principal del "nagana" (*G. pallidipes*) en 1954. *G. m. morsitans* desapareció del norte del país durante el brote de peste bovina que azotó el país entre 1896 y 1897. *G. brevipalpis* y *G. austeni* siguen presentes en la zona, aunque sólo han sido responsables de casos esporádicos de "nagana" hasta 1990 ([Kappmeier y col., 1998](#)).

T. vivax está presente, por lo menos, en 10 países del Caribe, América del Sur y Central. Probablemente, fue introducido en la Guyana francesa desde Senegal alrededor de 1830.

2.4. Diagnóstico

Los signos clínicos, junto con las lesiones patológicas, no son características suficientes para llegar a un diagnóstico definitivo de "nagana". Es necesario demostrar la presencia de los parásitos causantes de la enfermedad.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la tripanosomiasis animal se ha llevado a cabo mediante la identificación de especie por microscopía óptica y, teniendo en cuenta el tipo de huésped y área geográfica ([Hoare, 1972](#)). En las fases iniciales de la infección, especialmente con los tripanosomas hemáticos, los parásitos pueden ser observados fácilmente por medio del examen microscópico en frotis frescos de sangre. Los frotis y gotas gruesas de sangre fijada y teñida con colorante *Giemsa* pueden ser buenas técnicas de diagnóstico, sin embargo, en las extensiones finas, que se prefieren para la identificación de especies, los parásitos pueden ser difíciles de encontrar. Cuando la parasitemia es baja, los frotis de la capa leucocitaria (*buffy coat*) obtenida del microhematocrito por centrifugación pueden ser útiles para la detección de los parásitos. Como *T. congolense* tiende a asociarse con los eritrocitos, es esencial que la capa leucocitaria y los eritrocitos adyacentes sean incluidos en el frotis, para asegurar la demostración del parásito.

La tinción de improntas de ganglios linfáticos es un buen método de diagnóstico, especialmente para *T. vivax* y *T. b. brucei*. En infecciones crónicas por *T. congolense*, el diagnóstico se puede hacer a través de la localización de los parásitos en la microcirculación de los ganglios linfáticos.

En la actualidad, las técnicas moleculares han mostrado ser herramientas más sensibles y eficaces en la detección y caracterización de tripanosomas, en el vector y en los huéspedes mamíferos ([Masiga y col., 1992](#); [Majiwa, 1998](#); [Malele y col., 2003](#)).

El coste de estas pruebas, así como las limitaciones técnicas (equipamiento y formación de recursos humanos) que ofrecen la mayor parte de los laboratorios de campo en África, hacen que su uso se restrinja al ámbito de la investigación, o a la confirmación del diagnóstico de la infección en humanos.

2.5. Prevención y Control

Control vectorial

La erradicación de la mosca tsetsé es el único método efectivo de control de la tripanosomiasis. Varias técnicas se han utilizado para el control de la mosca tsetsé, con diferentes grados de éxito.

La destrucción racional de los matorrales o clareado de bosque, sistema empleado extensivamente en las primeras campañas de erradicación de la mosca tsetsé, resultó efectiva para el control de áreas reducidas ([Kappmeier y col., 1998](#)). Pero para que este control sea completamente efectivo, se requiere la destrucción masiva de extensas zonas de matorrales y de bosques, lo cual es ecológicamente inaceptable.

La eliminación de animales silvestres permitiría la interrupción de la transmisión, en el caso de la forma *rhodesiense*, ya que éstos constituyen la principal fuente de alimentación de la mosca, especialmente en África del Este y del Sur. Esta medida fue utilizada al principio de las campañas de erradicación, resultando ser poco efectiva y nada recomendable.

Los insecticidas, especialmente los organoclorados, han sido utilizados ampliamente para la erradicación de la mosca tsetsé. Las actividades de control mediante fumigación aérea secuencial con deltametrina en el delta del Okavango (Botswana), lograron la aparente eliminación de *Glossina morsitans centralis* ([Allsopp y Phillemon-Motsu, 2002](#)). La erradicación por medio de insecticidas tiene la tremenda desventaja de ser una estrategia poco selectiva, produciendo la muerte de otros artrópodos de interés ecológico.

Quimioterapia y quimioprofilaxis

El empleo de medicación para la prevención (*isometamidium* y *homidium*) y tratamiento de la tripanosomiasis (*diminazene*), son otros métodos de control disponibles en la actualidad ([Awa y Ndamkou, 2006](#)). Sin embargo, el desarrollo de resistencias a este tipo de drogas constituye un serio problema ([Geerts y Holmes,](#)

[1998; Geerts y col., 2001](#)).

Inmunización

Actualmente no existe una vacuna disponible contra la enfermedad, aunque existen numerosos candidatos en ensayo ([Uemura y col., 2005](#); [Rasooly y Balaban, 2004](#)). Se han hecho intentos para inmunizar a animales por medio de la infección y tratamiento, pero en todos los casos estas inmunizaciones experimentales han resultado fallidas. El principal obstáculo para el desarrollo de una vacuna efectiva es la asombrosa habilidad de los tripanosomas para cambiar o “mudar” de cubierta antigénica (glucoproteínas de superficie variable o GSV).

Tripanotolerancia

Desde hace tiempo, se sabe que ciertas razas de ganado son notoriamente más resistentes a la infección por tripanosomas que otras. Un ejemplo lo tendríamos en el ganado vacuno de cuerno corto de África Occidental (también llamado localmente Muturu, Baoule, Laguna, Samba, Dahomey) y en razas taurinas, como por ejemplo la denominada N'Dama, también presente en África Occidental. Estas especies de ganado pueden tolerar la presencia de tripanosomas y controlar los niveles de parasitemia sin llegar a desarrollar una patología severa con la consiguiente pérdida de producción, característica en animales susceptibles ([Kemp y Teale, 1998](#)).

La tripanotolerancia se basa en dos procesos. El primero, sería la capacidad para controlar la parasitemia, que no estaría mediada por células hematopoyéticas, linfocitos T o anticuerpos. La segunda, sería una mejor capacidad para no desarrollar anemia y estaría mediada por las células hematopoyéticas pero no por linfocitos T o anticuerpos. La ganancia de peso estaría asociada con este último mecanismo, de manera que el control de la anemia es más importante para la supervivencia y productividad del ganado que el control parasitológico ([Naessens, 2006](#)).

3. Tripanosomiasis Humana Africana (THA)

3.1. Generalidades

La tripanosomiasis humana africana (en adelante THA) o "enfermedad del sueño" es producida por dos especies: *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Las tres subespecies de *Trypanosoma brucei* s.l. son morfológicamente indistinguibles. La principal diferencia entre ellas es la capacidad de las formas infectivas humanas - gambiense y rhodesiense- de sobrevivir a la incubación con sangre o plasma humano, mientras que *T. b. brucei* sucumbe a los "factores tripanolíticos" asociados con una alta densidad de lipoproteínas en sangre humana ([Jenni y Brun, 1982](#); [Hager y Hajduk, 1997](#)).

Ambas especies se distribuyen en la zona tropical africana, en una franja comprendida entre los 15° N y 20° S, coincidiendo con la distribución de su vector, la mosca tsetse (*Glossina* sp, Diptera: Glossinidae) (**Figura 1**). La mosca tsetse vive en África, encontrándose en la vegetación de ríos, lagos, galerías forestales y vastas extensiones de sabana. Por razones hasta ahora desconocidas, hay zonas donde está presente el vector pero no se da la enfermedad, la cual siempre se distribuye en focos, más o menos extensos y muy bien delimitados.

T. b. gambiense se encuentra en África occidental y central, en tanto que *T. b. rhodesiense* se extiende por África oriental. Ambas zonas quedan separadas, aproximadamente, por el meridiano 30° E que pasa por los Grandes Lagos (**Figura 2**).

- Infección por *T. b. gambiense*: en claro aumento en África Central, la enfermedad cursa de forma crónica, leve e irregular. El reservorio principal es el humano, aunque la detección del parásito en ciertos mamíferos domésticos y salvajes hacen pensar en otros posibles reservorios potenciales no humanos ([Mehlitz y col., 1986](#); [Masiga y col., 1992](#); [Majiwa, 1998](#); [Malele y col., 2003](#)). El vector está presente en las orillas de los ríos o humedales en áreas de bosque tropical. Cabe destacar el papel de las glossinas ribereñas como *Glossina palpalis*, *tachinoides* y *fuscipes* en la transmisión de la THA por gambiense. Los pescadores son un grupo especial de riesgo. Es frecuente que la fase temprana de la enfermedad pase desapercibida y se diagnostique cuando ya hay afectación del sistema nervioso central (en adelante SNC).

- Infección por *T. b. rhodesiense*: la enfermedad cursa de forma aguda y grave (miocarditis, menos afectación del SNC). Los reservorios principales son animales salvajes (antílopes) y domésticos. El vector está presente en zonas de sabana, como *Glossina morsitans* y *pallidipes*. Enfermedad profesional accidental de origen zoonótico y rara vez en turistas ([Bryan y col., 1989](#); [Ponce de Leon y col., 1996](#); [Sinha y col., 1999](#); [Moore y col., 2002](#); [Ripamonti y col., 2002](#)).

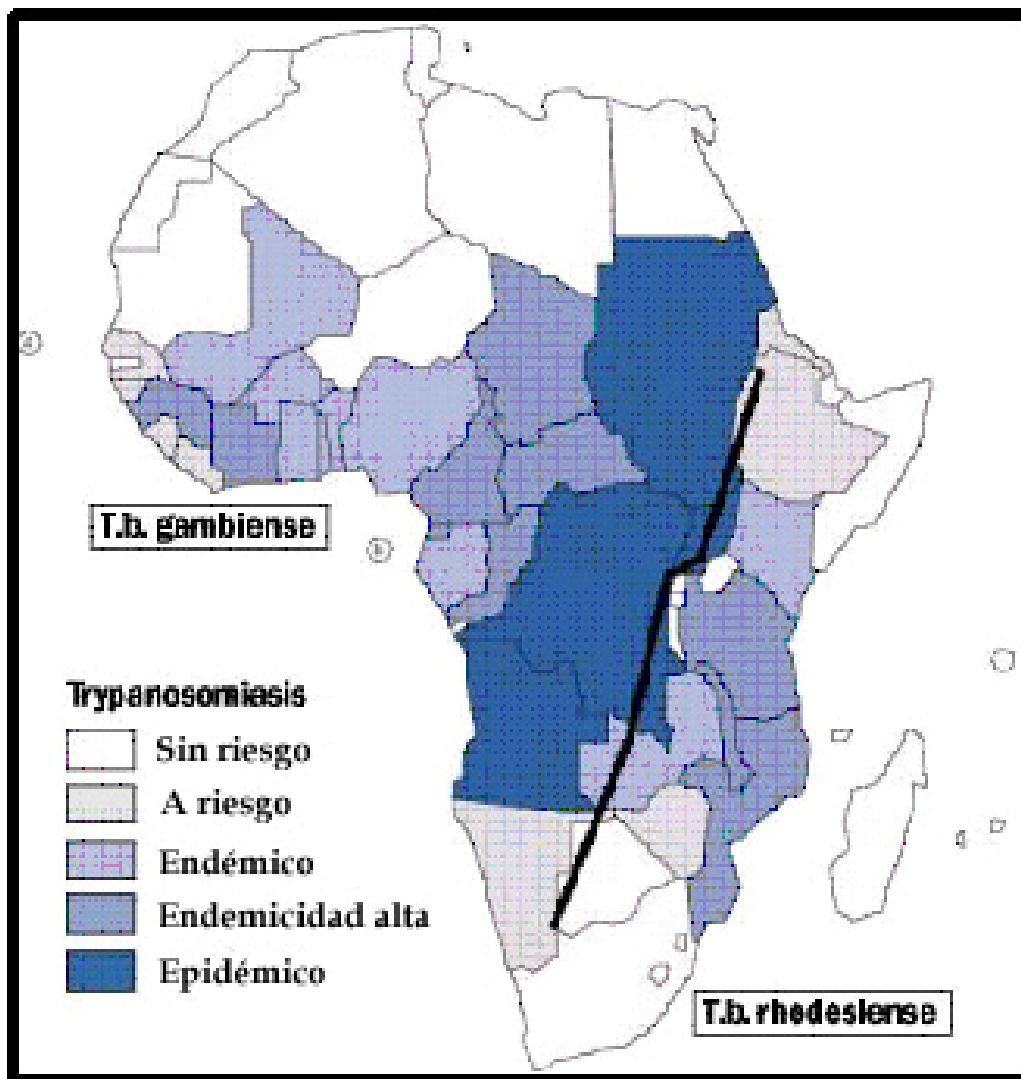


Figura 2. Distribución geográfica y endemicidad

Las dos especies se distinguen entre sí por el área de distribución, modo de transmisión, cuadro clínico (signos y síntomas) y características isoenzimáticas, entre otras (Tabla 1).

	Forma gambiense	Forma rhodesiense
Distribución geográfica	África del Oeste y Central	África del Este
Organismo	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
Vectores	Mosca tsetsé (grupo <i>palpalis</i>)	Mosca tsetsé (grupo <i>morsitans</i>)
Reservorio primario	Humano	Antílope y gato
Enfermedad humana	Crónica (afección SNC tardía)	Aguda (afección SNC precoz)
Duración de la enfermedad	Meses a años	Menos de 9 meses
Linfadenopatías	Prominentes	Mínimas
Parasitemia	Baja	Elevada
Diagnóstico por inoculación en roedores	No	Sí
Epidemiología	Población rural	Turistas, trabajadores de parques naturales o áreas salvajes o población rural

Tabla 1. Comparación de la tripanosomiasis gambiense y rhodesiense

3.2. Etiología y Clínica

La sintomatología de la enfermedad es variada y cada individuo puede experimentar los síntomas de forma diferente. Éstos aparecen en el plazo de una a cuatro semanas de la infección, en el caso de *T. b. rhodesiense*, y de varias semanas a meses en *T. b. gambiense*. Se han clasificado en dos estadios o fases dependiendo de si el parásito está o no presente en el líquido cefalorraquídeo:

1. **Estadio 1 o precoz.** Tras la inoculación, los parásitos proliferan en el lugar de la infección, produciendo un nódulo inflamatorio o úlcera. Este chancro tripanosomal es patente en el 50% de las infecciones por la forma *rhodesiense* y raramente en las infecciones por la forma *gambiense*. Después de 3 a 4 semanas el chancro cicatriza, en ocasiones con alteración de la pigmentación. Los parásitos se extienden por el torrente circulatorio a través del sistema linfático (ganglios linfáticos), iniciándose el estadio hemolinfático de la enfermedad.

Durante este estadio la sintomatología es bastante inespecífica y variable: malestar general, dolor de cabeza y fiebre intermitente. En la infección por *T. b. rhodesiense*, que cursa de forma aguda, puede darse pancarditis con fallo cardíaco congestivo, efusión pericardial y edema pulmonar, que pueden ser fatales para el huésped humano. La infección por *T. b. gambiense* rara vez es fatal en este estadio de la infección, y con frecuencia cursa sin que llegue a ser diagnosticada. En este último caso, un signo característico es linfadenopatía generalizada que se desarrolla después de varias semanas tras la infección, y que es especialmente llamativa en el triángulo posterior del cuello. Esta linfadenopatía cervical se conoce como signo de Winterbottom.

También pueden observarse en este estadio; rash circinado, prurito y edema generalizado, que pasan bastante desapercibidos en población nativa.

En este estado los parásitos pueden ser detectados en sangre, linfa o aspirados ganglionares. Sin embargo, los niveles de detección son bastante bajos, especialmente en la infección por la forma *gambiense*, incluso empleando métodos de concentración.

2. **Estadio 2 o avanzado.** En este estadio de la infección el parásito invade los órganos internos, incluyendo el SNC ([Enanga y col., 2002](#); [Pentreath, 1995](#)). Esto ocurre a las pocas semanas, en el caso de la infección por *T. b. rhodesiense*, mientras que en la infección por *T. b. gambiense* puede ocurrir varios meses o años tras la infección. La inmunosupresión acompaña este estadio, implicados tempranamente el óxido nítrico y prostaglandinas, y más tardíamente citoquinas, incluyendo la interleuquina 10, la cual alcanza concentraciones altas en el líquido cefalorraquídeo (en adelante LCR). El cómo y porqué los parásitos invaden el SNC no están claros, aunque el portal de entrada es probablemente el plexo coroideo. A medida que avanza el estadio 2 los dolores de cabeza se intensifican y aparecen desórdenes del sueño, causado por la alteración del ritmo circadiano normal. Hay alteraciones

manifiestas del comportamiento (irritabilidad, falta de concentración, confusión progresiva), convulsiones, dificultad para caminar y para hablar, somnolencia, meningoencefalitis y por último la muerte ([Bryan y col., 1989](#)).

Rara vez se observan los parásitos en el LCR, aún empleando técnicas de concentración como la doble centrifugación. La respuesta inflamatoria (leucorraquia), así como la concentración de proteínas en LCR (proteínorraquia, >25 mg/100 ml), constituyen los dos factores fisiopatológicos principales, siendo indicadores de diagnóstico. Todavía se debate sobre el umbral de leucorraquia y proteínorraquia para la definición y caracterización del estadio 2.

3.3. Epidemiología y distribución geográfica

En 1902 Dutton y Ford, dos médicos ingleses que trabajaban en Gambia, identificaron a *T. b. gambiense* como agente causal de la tripanosomiasis humana. Un año después, Sir David Bruce identificó a la mosca tsetsé como el vector del parásito de la tripanosomiasis humana.

La enfermedad del sueño es considerada una enfermedad re-emergente y está incluida en el grupo de enfermedades olvidadas ([Cattand y col., 2001](#)). A finales de la década de los 90, y hasta el año 2001, se estimaba que 60 millones de personas se encontraban en situación de riesgo de infección en 36 países de África subsahariana, de los que 22 figuraban entre los países menos adelantados del mundo, y que entre 300.000 a 500.000 personas se encontraban infectadas ([OMS, 2001c](#)). Sin embargo, en los últimos 4 años la situación epidemiológica ha mejorado sensiblemente gracias al incremento de las actividades de vigilancia y, por tanto, al aumento de población controlada. Así, en la actualidad se estima que el número de nuevos casos por año se ha reducido a 17.500 y que la tasa acumulativa se establece entre 50.000 y 70.000 casos ([OMS, 2006](#)).

La vigilancia no es sólo esencial para plantear posibles intervenciones sino también para asegurar la iniciación de tratamientos tempranos que permitan eliminar la enfermedad antes de que su progresión la haga menos tratable. Sin embargo, la vigilancia de la enfermedad abarca sólo a 3-4 millones de personas, y los 45.000 casos notificados anualmente no reflejan la realidad de la situación, sino simplemente la ausencia de actividades de detección de casos.

La mayor parte de los países de África Central presentan una incidencia anual menor

de 1.500 casos. Supera con creces esta cifra la República Democrática del Congo (en adelante RDC), donde la enfermedad está presente en 10 provincias. Durante el año 2004, se diagnosticaron en RDC un total de 10.369 casos, incidencia mucho más baja que la de años anteriores teniendo en cuenta, además, que el número de población controlada ha ido en aumento ([OMS, 2006](#)).

La enfermedad del sueño afecta, principalmente, a zonas rurales remotas donde los sistemas de salud son menos eficientes, o no existen. La población rural que vive en estos medios y depende 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 en general.

Como dijimos anteriormente, la enfermedad se presenta focalmente. El tamaño de estos focos puede variar desde un solo poblado a una región entera. En la actualidad hay descritos 259 focos que se distribuyen en 36 países africanos ([Cattand y col., 2001](#)) (**Figura 3**). Dentro de un foco, la intensidad de la enfermedad puede variar considerablemente de un poblado a otro, llegando incluso a encontrarse poblados de alto riesgo o de elevada endemidad próximos a poblados donde durante años no se han detectado casos ([Cattand y col., 2001](#)).

En el siglo XX se han sufrido tres grandes epidemias. La primera entre 1896 y 1906, que afectó principalmente a Uganda y la cuenca del Congo. La segunda en 1920 que implicó a muchos países africanos. Y una tercera al comienzo de los años 70, que se prolonga hasta la actualidad. La epidemia de 1920 fue controlada gracias a los ingentes esfuerzos desplegados por equipos móviles que estudiaron millones de personas en situación de riesgo. La enfermedad prácticamente había desaparecido entre 1960 y 1965. Después del éxito alcanzado, se pasó a un periodo de abandono de la vigilancia epidemiológica que hizo que la enfermedad reapareciera de forma endémica en muchos de los focos controlados.

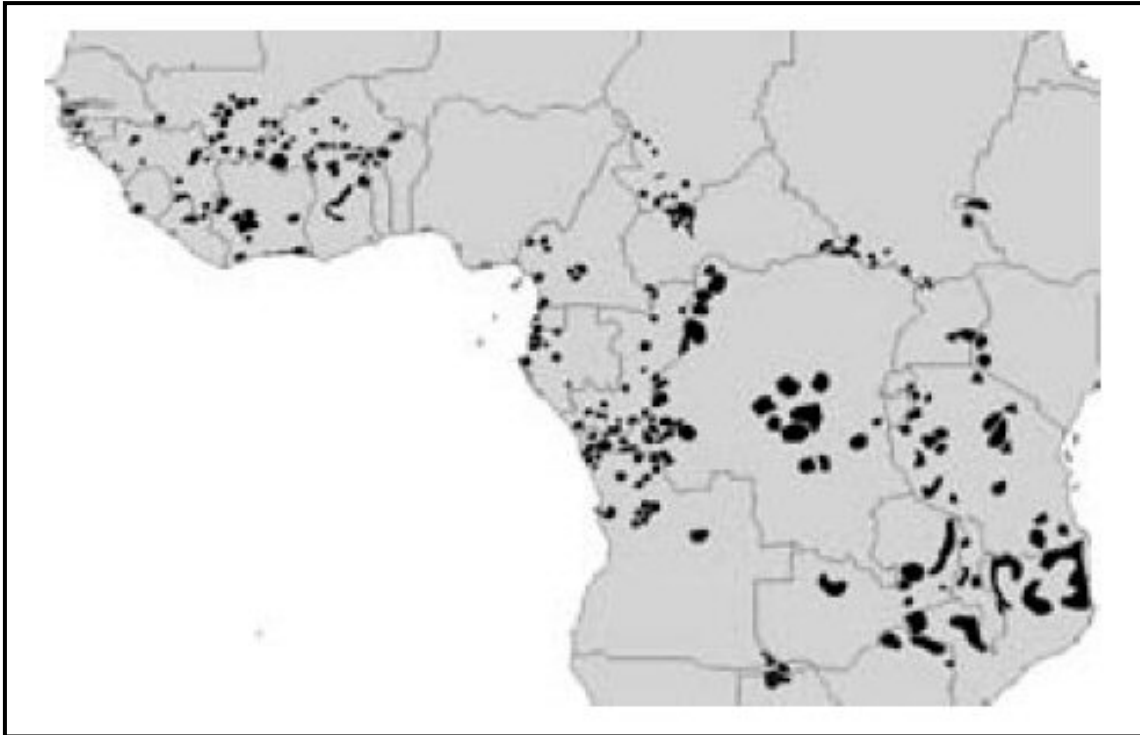


Figura 3. Distribución geográfica de los focos de gambiense y rhodesiense

En términos de prevalencia, es posible clasificar en 4 categorías a los países africanos donde la enfermedad está presente (**Figura 2**).

- Países donde la enfermedad se presenta como una epidemia, en términos de alta prevalencia acumulada y alta transmisión: Angola, RDC y Sudán;
- Países donde la enfermedad es altamente endémica, donde la prevalencia es moderada pero en claro incremento: Camerún, República Centroafricana (en adelante RCA), Chad, Congo, Costa de Marfil, Guinea Conakry, Guinea Ecuatorial, Mozambique, Uganda y Tanzania;
- Países donde la endemidad es baja: Benin, Burkina Faso, Gabón, Kenia, Malí, Togo, Nigeria y Zambia;
- Países cuyo estatus epidemiológico no está claro: Botswana, Burundi, Etiopía, Liberia, Namibia, Ruanda, Senegal y Sierra Leona.

Recientemente, se ha establecido una clasificación más precisa en base a la incidencia de casos por año ([Simarro y col., 2008](#)), teniendo en cuenta los datos disponibles entre 1997 y 2006:

	<i>T. b. gambiense</i>	<i>T. b. rhodesiense</i>
Más de 1.000 casos/año	Angola, RDC y Sudán	
100-1.000 casos/año	Chad, RCA, Congo y Uganda	Tanzania y Uganda
Menos de 100 casos/año	Camerún, Costa de Marfil, Guinea Ecuatorial, Gabón, Guinea Conakry y Nigeria	Malawi y Zambia
Casos esporádicos		Kenia, Mozambique, Ruanda y Zimbabwe
No hay nuevos casos y si actividades de control	Benín, Burkina Faso, Ghana, Mali y Togo	Bostswana, Burundi, Etiopía, Namibia y Swazilandia
No hay nuevos casos y tampoco actividades de control	Gambia, Guinea Bissau, Liberia, Níger, Senegal y Sierra Leona	

Tabla 2. Nuevos casos registrados entre 1997 y 2006

3.4. Diagnóstico

La parasitemia aparece en oleadas de intensidad variable en los casos no tratados, y se observa en todas las etapas de la enfermedad.

El diagnóstico directo se hace por la demostración de los *tripomastigotes* mediante el examen microscópico de: el fluido del chancro, el aspirado de ganglios linfáticos, la sangre, la linfa, la médula ósea y/o en el LCR, en las fases tardías de la enfermedad. De forma rutinaria, se hace una preparación en fresco para detectar las formas móviles, y otra se fija y tiñe con colorante Giemsa o Field.

El diagnóstico directo en muestras de sangre mejora en sensibilidad empleando métodos de concentración de los parásitos, como la centrifugación en tubo capilar seguida del examen de la capa leucocitaria, o empleando la filtración en columna de intercambio aniónico. Para otras muestras como el LCR, las técnicas de concentración se basan en la centrifugación doble seguida del examen del sedimento.

El diagnóstico indirecto se puede establecer, en la forma *rhodesiense*, mediante la

inoculación a ratas o ratones de laboratorio. Otro método indirecto consiste en la detección de anticuerpos específicos por medio de técnicas como ELISA, inmunofluorescencia indirecta y aglutinación, ya que en la tripanosomiasis es frecuente observar niveles altos de inmunoglobulinas, en especial IgM. En la forma *rhodesiense* esta técnica tiene una utilidad limitada, puesto que la seroconversión se produce después del comienzo de los síntomas clínicos. Sin embargo, los métodos de aglutinación directa, como el CATT (*Card Agglutination Test for Tripanosomes*) e indirecta CIATT (*Card Indirect Agglutination Test for Tripanosomes*) ([Nantulya, 1997](#)) son muy valiosos en encuestas epidemiológicas para la detección de *T. b. gambiense*.

El empleo de herramientas moleculares para el diagnóstico de la tripanosomiasis se encuentra en fase experimental. Son numerosas las pruebas diseñadas de amplificación de ADN específico de *T. b. gambiense* ([Hide y col., 1990](#); [Bromidge y col., 1993](#); [Kanmogne y col., 1996](#); [Radwanska y col., 2002](#)) y *T. b. rhodesiense* ([Welburn y col., 2001](#); [Picozzi y col., 2006](#)), aunque existen numerosas limitaciones que afectan a la recogida y conservación de la muestra, estandarización de los protocolos de extracción de ADN, y reproducibilidad de las técnicas de amplificación de ADN especie-específico ([Kyambadde y col., 2000](#); [Solano y col., 2002](#)).

3.5. Prevención y Control

Como vimos en el capítulo anterior, el agente causal de la enfermedad y su forma de transmisión mediante la mosca tsetse no se identificaron hasta principios del siglo XX. En la década de los años 20, la enfermedad provocó graves daños en África subsahariana, organizándose campañas de erradicación mediante detección sistemática de casos con equipos móviles y actividades de lucha antivectorial, que permitieron mantener la enfermedad bajo control hasta bien entrada la década de los 60. Pero desafortunadamente, en los años siguientes, con el empobrecimiento del continente y los problemas colaterales a la descolonización (emigración de los niveles superiores de las administraciones, guerras por el cambio de fronteras o regímenes políticos, etc.), la enfermedad del sueño volvió a convertirse en el azote de este continente ([OMS, 2001b](#)).

A mediados de 2001, diferentes organizaciones supranacionales: Fondo Alimentario Mundial (en adelante FAO), Organización Mundial de la Salud (en adelante OMS), y Organización de Estados Africanos (en adelante OUA), en colaboración con Organizaciones no Gubernamentales (en adelante ONGs) y agencias nacionales de salud,

lanzaron el Programa contra la Tripanosomiasis Africana (en adelante PAAT), a la que siguió poco después la Campaña Panafricana de Erradicación de la mosca tsetse y la Tripanosomiasis (en adelante PATTEC). Estas acciones pretenden la erradicación de la enfermedad, tanto a nivel humano como animal. En este último caso, debido a las repercusiones económicas que la pérdida del ganado tiene sobre la alimentación y la distribución poblacional.

A estos programas se han incorporado activamente 22 de los 36 países en los que la enfermedad es endémica. Guinea Ecuatorial entre ellos, a través de su Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis Humana Africana.

Los objetivos principales de ambos programas son ([OMS, 2001b](#)):

A nivel del hospedador humano

- **Vigilancia epidemiológica** de la población en situación de riesgo (focos) por equipos médicos especializados, usando métodos serológicos (diagnóstico indirecto) y parasitológicos (diagnóstico directo) para la detección activa de casos.
- **Apoyo hospitalario** en las áreas de transmisión para confirmación, tratamiento y seguimiento de los casos sospechosos.

A nivel del vector

- **Control vectorial:** el control de la mosca tsetse es la principal medida para frenar la propagación de los tripanosomas patógenos al hombre y al ganado. Para *T. b. gambiense* la eliminación temporal de moscas tsetse infectadas e infectivas nos lleva a la "esterilización" del reservorio humano, logrando así interrumpir el ciclo de transmisión. Esto resulta difícil de alcanzar, si tenemos en cuenta la cronicidad de las infecciones por la forma *gambiense*. En el caso de *T. b. rhodesiense*, el impacto de las actividades de control vectorial sobre la transmisión resulta más evidente.

Existe una gran variedad de métodos de control; fumigación aérea y terrestre, liberación de machos estériles, alteración de los biotopos (deforestación y lavados de subsuelo), empleo de trampas, etc. La selección de un método de control u otro, vendrá condicionada por los recursos económicos y humanos disponibles, y el ecosistema del vector.

En los últimos años hay un resurgir del empleo de trampas para el control. Las trampas para mosca tsetse pueden cumplir una doble función: capturar y/o matar. Durante años, se han empleado en vigilancia entomológica y también para el control. Las

trampas son recomendables en caso de que el foco esté muy delimitado y haya un riesgo importante de transmisión en las proximidades de las poblaciones humanas.

Existen diversos diseños de trampas y su eficacia depende del comportamiento de la especie de glosina a la que van dirigidas y del ecosistema. Por tanto, no todas son igualmente efectivas para cualquier especie ([Kuzoe y Schofield, 2004](#)).

Por ejemplo, algunas trampas dependen de la proximidad humana para su funcionamiento. Son especialmente idóneas para el control de especies altamente antropofílicas. Es el caso de las trampas "pegajosas", que consisten en una superficie adherente fijada a la ropa de trabajadores de campo. Fueron muy empleadas a comienzos del siglo pasado para la erradicación de *G. p. palpalis* de las plantaciones de cacao en la Isla de Príncipe ([Da Costa y col., 1916](#)). Sin embargo, algunas especies escapan ante la presencia humana ([Vale, 1969](#)). Sustancias liberadas de manera natural por la piel (ácido láctico), tienen un efecto repelente hacia las hembras de ciertas glosinas vectoras. Este es el caso de algunas especies importantes pertenecientes al grupo **morsitans**, principales vectores en el este de África ([Hargrove, 1991](#))

De forma general, todas las trampas diseñadas se basan en el atractivo que ciertos colores -negro y azul- y el movimiento, ejercen sobre las glosinas. Con el fin de incrementar la efectividad de las trampas, en los últimos años se está experimentando con algunas sustancias que tendrían un marcado efecto atrayente. Este es el caso de la acetona y el octenol (1-octen-3-ol), potentes atrayentes olfatorios para *G. m. morsitans* y *G. pallidipes* ([Vale y col., 1986](#)).

Para las moscas tsetsé de importancia médica (principalmente grupo **palpalis**), se han desarrollado todo un conjunto de trampas a partir de la trampa bicónica Challier-Laveissière, hecha a base de dos colores: azul para atraer a las moscas, y negro para simular lugares de reposo. La investigación y el empleo práctico de estas trampas en campañas de control han tenido como escenarios principales países de África Central y Occidental, como Costa de Marfil, Uganda, RDC y RCA.

Estos métodos simples, flexibles y rápidos no tienen un impacto directo sobre el ambiente y son menos costosos que los métodos tradicionales. Por tanto, representan un paso hacia delante en el control de la población de mosca tsetsé.

Sin embargo, la necesidad de trabajar rápidamente en un foco, actuando sobre áreas extensas, requiere de mucha ayuda por parte de la población local (participación comunitaria), para colaborar en el montaje, vigilancia y mantenimiento de las trampas.

Esto se consigue haciendo partícipes del proceso a los pobladores y a las comunidades itinerantes (dedicadas al pastoreo) afectadas.

4. Tripanosomiasis en la República de Guinea Ecuatorial

4.1. Generalidades

Los programas de vigilancia y control de la THA fueron implantados en la República de Guinea Ecuatorial a comienzos de 1930, lográndose una disminución drástica de la prevalencia de la enfermedad a finales de 1960 ([Penchenier y col., 1996](#)).

Guinea Ecuatorial tampoco escapó a la gran epidemia de los años setenta que asoló el África subsahariana. La instauración de regímenes dictatoriales postcoloniales, más preocupados en eliminar cualquier vestigio del periodo anterior que de mantener aquellas estructuras administrativas que podrían haber favorecido la buena gobernabilidad de las naciones recién creadas, sería una de las posibles causas de la tercera epidemia de THA en el continente. Por otra parte, la excesiva verticalidad de las campañas emprendidas, así como el escaso interés por transferir conocimientos a la población nativa, también pudieron favorecer el abandono de dichas actividades de control por las nuevas autoridades gubernativas, desconocedoras de las repercusiones sanitarias y sociales de un posible rebrote de la endemia.

A mediados de 1980, alertados por el elevado número de casos de tripanosomiasis diagnosticados en el Hospital Provincial de Luba (Isla de Bioko), el Ministerio de Sanidad y Bienestar Social de la República de Guinea Ecuatorial (en adelante MINSABS) crea el Programa Nacional de Control de la Tripanosomiasis (en adelante PNCTHA), que queda bajo la tutela de la Dirección General de Salud Pública y Planificación Sanitaria. Además, con el apoyo técnico y económico de la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (en adelante AECID) se crea el Centro de Control de la Tripanosomiasis (en adelante CCT) en Bata, capital de la región continental.

En los primeros años de funcionamiento el programa examinó a gran parte de la población que habitaba en los focos, detectándose 508 casos en 1985 y 386 en 1986 ([Simarro y col., 1988](#)). En los años sucesivos ha ido disminuyendo la incidencia de casos gracias a las encuestas de detección activa y al tratamiento de todos los casos

([Simarro y col., 1991b](#)).

Hasta la fecha, no hay información sobre la infección por tripanosoma en ganado peridoméstico o salvaje ni sobre el papel que pudieran jugar como potenciales reservorios de *T. b. gambiense*.

4.2. Epidemiología y distribución geográfica

Actualmente, hay declarados cuatro focos de la enfermedad del sueño en Guinea Ecuatorial ([Simarro y col., 1988](#)). Históricamente, el más importante se localiza en el distrito de Luba (Isla de Bioko), pero desde 1995 no se han confirmado nuevos casos ([Simarro y col., 2006](#)). Los otros tres focos, todavía activos, están en la zona continental; Río Campo (distrito de Bata), Mbini (distrito de Mbini) y Kogo (distrito de Kogo) (**Figura 4**).

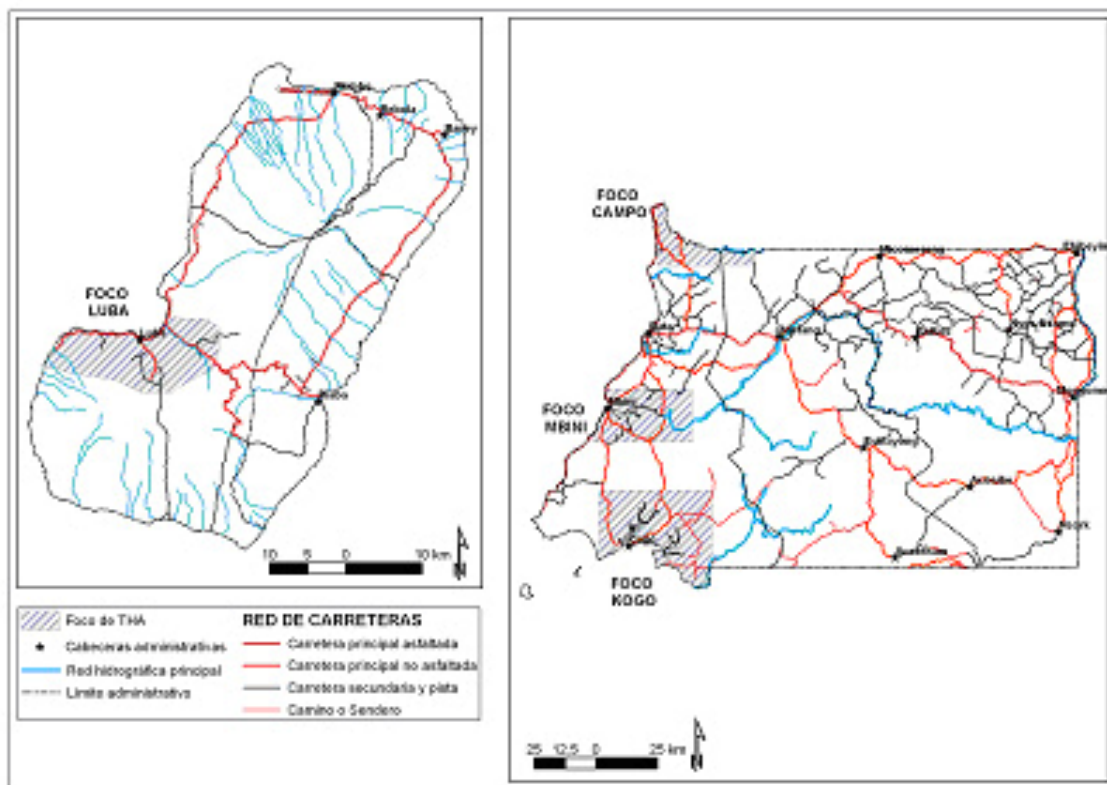


Figura 4. Situación geográfica de los focos de tripanosomiasis en Guinea Ecuatorial

La primera descripción de la situación de la endemia en el país fue realizada por Pittaluga en 1910 ([Pittaluga, 1919](#)). A partir de 1930, durante el periodo colonial, se puso en marcha un sistema de control basado en el examen clínico y parasitológico realizado de

forma exhaustiva y obligatoria a toda la población. Este primer programa permitió controlar la endemia, pasándose de 748 casos en 20.200 personas examinadas en 1933 a 30 casos en 403.822 personas examinadas en 1967 ([González Vicente y col., 1968](#)).

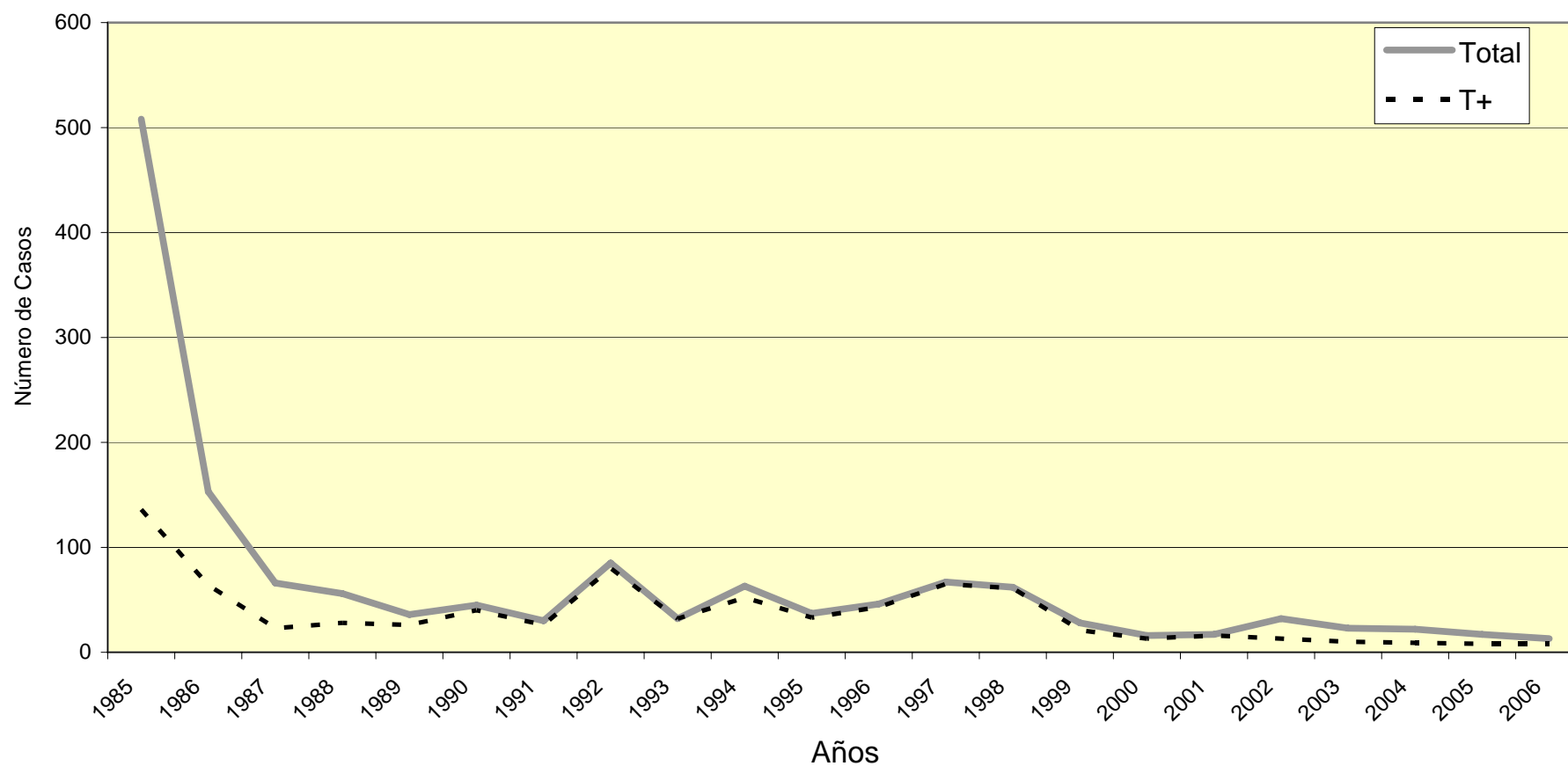
Tras la independencia, las actividades de control se fueron abandonando paulatinamente. A principios de los años 80, se detectó un incremento de casos diagnosticados de forma pasiva en las estructuras sanitarias de las áreas endémicas (focos históricos). Por esta razón, el MINSABS decide crear el PNCTHA que, apoyado por la AECID, ha trabajado intensamente en los últimos 27 años reduciendo, de manera significativa, el número de casos diagnosticados en los 4 focos históricos (**Figura 5**).

En la actualidad, el PNCTHA continúa controlando la enfermedad mediante encuestas periódicas de despistaje o detección activa y gestionando aquellos casos sospechosos remitidos desde los centros sanitarios localizados en los focos (detección pasiva). En los últimos 4 años también ha incorporado la lucha antivectorial como una medida complementaria de control, siguiendo siempre las recomendaciones y protocolos de la OMS ([OMS, 2001a](#)) basados en métodos de bajo impacto ecológico ([Barret y col., 2003](#)).

Teniendo en cuenta que el foco insular de Luba se encuentra en fase de eliminación ([Simarro y col., 2006](#)), y en las encuestas de seroprevalencia llevadas a cabo en los focos de la región continental durante el año 2005 se registró una prevalencia de casos de 0,21% en Río Campo, 0,13% y 0,25% en sendas encuestas en Mbini, y 0.03% en Kogo, podemos deducir que la THA no constituye, en la actualidad, un problema de salud pública en Guinea Ecuatorial.

Ante este panorama epidemiológico es importante tener presente que el abandono de las actividades de vigilancia en países donde la enfermedad está controlada - pero no eliminada - puede derivar en la aparición de rebrotes de los focos históricos y en la aparición de nuevos focos, con unas tasas de mortalidad elevadas ([Louis y col., 2002](#)).

Figura 5. Evolución de los casos detectados en Guinea Ecuatorial (1985-2006)



T+: casos diagnosticados con confirmación parasitológica

4.3. Diagnóstico

La **Figura 6** describe el protocolo empleado por el PNCTHA de Guinea Ecuatorial para la detección de casos.

Diagnóstico serológico

En la actualidad, por su efectividad y sencillez, se emplea la prueba de aglutinación directa en tarjeta (en adelante CATT) para el despistaje de casos. Anteriormente, también se empleaba la Inmunofluorescencia Indirecta (en adelante IFI), pero se ha desestimado debido a las dificultades técnicas que plantea esta técnica en comparación al CATT.

En las encuestas de detección activa, el CATT se realiza en sangre total, para la discriminación de casos, y en diluciones progresivas de suero (titulación), para la orientación diagnóstica de casos parasitológicamente negativos.

Diagnóstico Parasitológico

Entre los diferentes métodos existentes, el PNCTHA ha seleccionado los siguientes:

- En líquido linfático: la punción ganglionar y observación del aspirado ganglionar en fresco.

La **punción ganglionar**, y observación del aspirado ganglionar en fresco, es un método sencillo, barato, rápido y altamente eficaz, que permite detectar la presencia del parásito en líquido linfático. Por el contrario, es un método poco sensible.

- En sangre: la centrifugación en tubo capilar (en adelante CTC) o técnica de Woo y la filtración en columna de intercambio aniónico o *mini-Anion Exchange Column Test* (en adelante mAECT).

La **CTC**, o técnica de Woo, es un método de concentración, eficaz y sencillo, que permite analizar 50 µl de sangre por tubo capilar recogido.

- En LCR, la centrifugación y doble centrifugación del LCR obtenido por punción lumbar (en adelante PL).

Simple y doble centrifugación del LCR: el examen simple del LCR, o mejor aún, tras su centrifugación o doble centrifugación, permite en muchos casos detectar el parásito, permitiendo también la determinación del estadio a partir del

análisis de ciertos indicadores fisiopatológicos (leucorraquia y proteinorraquia). Son métodos sencillos de ejecutar pero requieren cierto aparataje (centrífuga).

Diagnóstico de estadio

Determina si el parásito ha atravesado o no la barrera hematoencefálica afectando al SNC. Con ello se define la fase evolutiva en que se encuentra el paciente, hecho que condiciona el tripanocida a emplear. El método fundamental de diagnóstico de estadio es la búsqueda del parásito en el LCR, que ha sido señalada en el epígrafe anterior. Dada la insuficiente sensibilidad de esta técnica se utilizan otros métodos complementarios.

Dentro del PNCTHA se emplea el **recuento de leucocitos en LCR mediante cámara de Neubauer**.

Es un método fiable, sencillo, rápido y fácil de ejecutar, fundamental para la toma de decisiones terapéuticas.

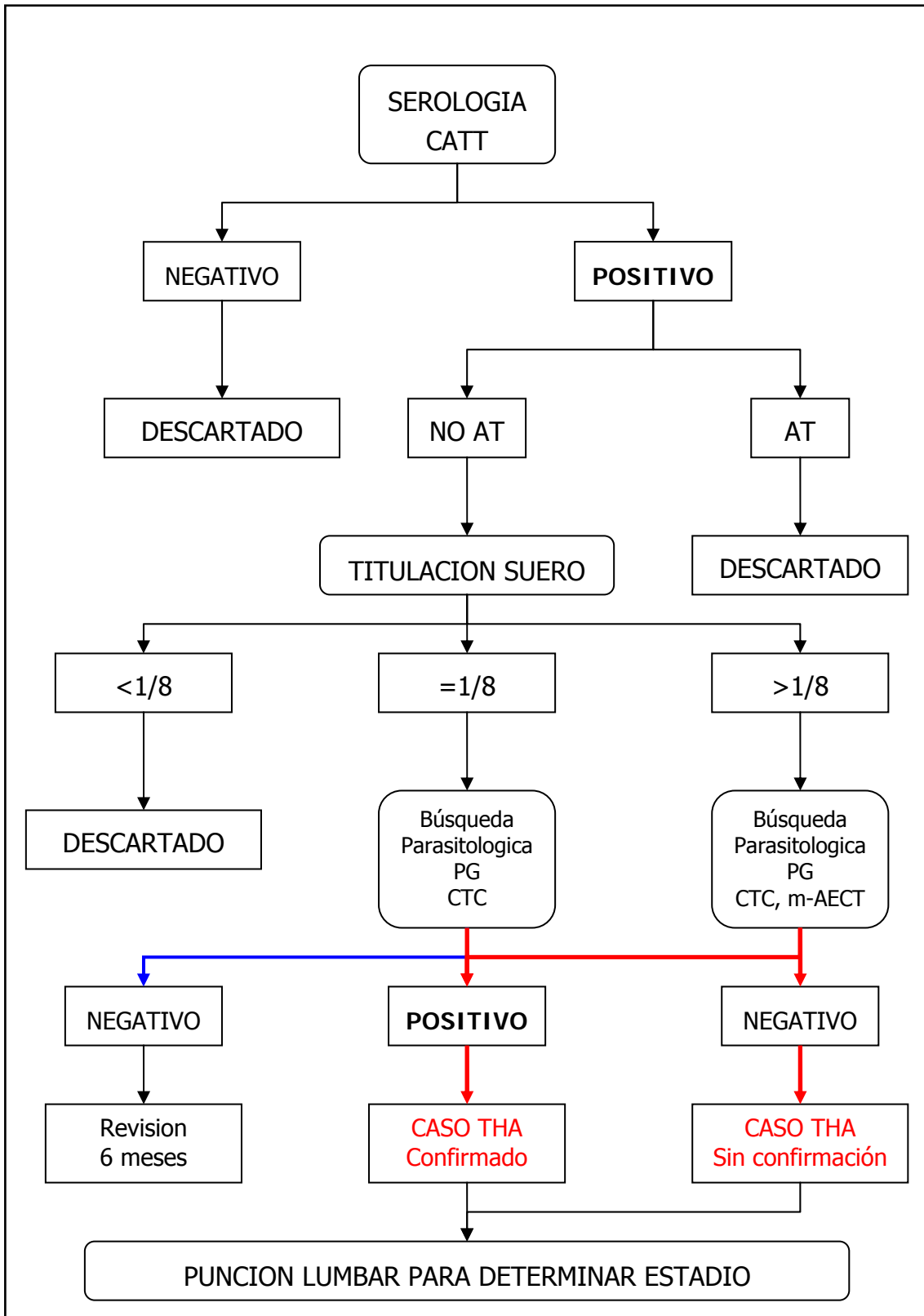


Figura 6. Protocolo de detección de casos del PNCTHA, Guinea Ecuatorial

AT: antígeno tripánico; CTC: centrifugación de sangre en tubo capilar; PG: punción ganglionar; m-AECT: filtración en columna de intercambio aniónico

4.4. Prevención y Control

A nivel del hospedador humano

Teniendo en cuenta que el principal reservorio de la tripanosomiasis por *T. b. gambiense* lo constituye el ser humano infectado, la estrategia de control del PNCTHA se fundamenta en la eliminación del reservorio mediante la detección de los casos y su correcto tratamiento (según estadio). La detección de casos puede ser: activa y pasiva.

La **detección activa** de casos, mediante encuestas seroparasitológicas periódicas realizadas a toda la población de los focos, es una acción prioritaria del PNCTHA. Estas encuestas se realizan a toda la población expuesta a contraer esta enfermedad y son llevadas a cabo por los equipos móviles del PNCTHA, apoyados por el equipo de controladores formados en cada distrito donde la enfermedad es endémica.

La detección activa de casos se realiza en dos etapas:

1. Encuesta serológica; que permite detectar rápidamente personas con presencia de anticuerpos y que son consideradas como serológicamente sospechosas.
2. Búsqueda parasitológica; en las personas serológicamente sospechosas, lo que permite descartar o confirmar la sospecha.

El cribaje serológico de la población en riesgo permite que se pueda detectar a los enfermos en las fases más precoces de su enfermedad, facilitando así su tratamiento y curación.

La **detección pasiva** se lleva a cabo en cada hospital distrital y en el CCT. En los hospitales distritales situados en los focos, así como en el Hospital Regional de Bata, ante todo caso que presente sintomatología compatible con THA se considera el diagnóstico. Se realiza punción ganglionar para buscar parásitos y en caso negativo, se toma una muestra para su remisión al CCT, donde se realizan análisis serológicos.

En el CCT se atiende a las personas que acuden espontáneamente o son remitidas desde otros centros sanitarios. A estas personas se les realiza una anamnesis, examen clínico y análisis serológico.

La ejecución de las actividades del PNCTHA está parcialmente horizontalizada, ya que en las encuestas de detección activa participa personal sanitario formado de los diferentes distritos donde la enfermedad es endémica. Además, dicho personal se encarga de notificar la detección de sospechosos al centro de referencia de Bata (detección pasiva).

Los datos recogidos en cada localidad endémica y a riesgo (poblado y barrios) durante las encuestas seroparasitológicas, junto con los datos epidemiológicos de cada enfermo son remitidos al CCT, donde el personal del PNCTHA, en colaboración con los asesores del programa, elaboran un mapa epidemiológico anual con la distribución de casos de acuerdo a los posibles lugares de transmisión.

A nivel del vector

Las primeras experiencias de lucha antivectorial con trampas en Guinea Ecuatorial tuvieron lugar en el foco insular de Luba en el año 1985 ([Simarro y col., 1990](#)). Durante 3 meses, se llevó a cabo un estudio para determinar la distribución y densidad de los vectores de la THA en el poblado de Bombe (foco de Luba), especies de glossinas presentes en el foco, y eficacia de las nuevas trampas piramidales ([Gouteux y Lancien, 1986a](#)) en la captura y control de glossinas (**Foto 1**).



Foto 1. Trampa piramidal localizada en las proximidades de un pozo

G. p. palpalis fue identificada como responsable de la transmisión de la THA en el foco insular, siendo las plantaciones de cacao circundantes a las viviendas las áreas de

mayor riesgo de contacto con este vector. Como consecuencia de la actividad con trampas, la densidad aparente (DA: nº de moscas tsetsé/trampa/día) en la zona pasó de 4 a 0,4 en tres meses. Además, se observó que el promedio de edad de las poblaciones de *G. p. palpalis* en la zona descendió con el paso del tiempo, siendo de 15 días al finalizar el estudio.

Sin embargo, a pesar de los buenos resultados obtenidos, el control vectorial con trampas no pasó a formar parte de la estrategia de prevención y control del PNCTHA hasta el año 2002. En este año, el PNCTHA, con la asistencia técnica del Centro Nacional de Medicina Tropical-Instituto de Salud Carlos III (en adelante CNMT-ISCIII) puso en marcha una campaña de control vectorial en los focos más activos: Kogo y Mbini.

En Kogo se distribuyeron 78 trampas piramidales en embarcaderos y secaderos de la cuenca del río Mitong, y en Mbini 93 trampas piramidales en poblados y barrios del epicentro, y secaderos del río Wele.

En Kogo, entre el mes de abril y diciembre de 2002, se recolectaron un total de 28.573 moscas tsetsé. La DA global dentro del foco disminuyó de 2,87 a 0,57.

En Mbini, se recolectaron un total de 21.312 glossinas desde el mes de julio de 2002 hasta enero de 2003. La DA global dentro del foco disminuyó de 4,19 a 0,44.

De esta experiencia en los focos continentales se concluyó que:

- Las trampas piramidales mostraron una alta eficacia en la reducción del contacto hombre vector en los focos endémicos de Kogo y Mbini.
- Las actividades de control vectorial en los focos más activos de Guinea Ecuatorial podrían asegurar el éxito en la interrupción de la transmisión.
- Las trampas piramidales resultaron ser altamente eficaces en un ecosistema tan particular como es el manglar.

En una segunda fase de la lucha antivectorial (año 2003) se evaluó la efectividad de las pantallas impregnadas con deltametrina. Este tipo de trampa ha demostrado ser eficaz en el control de las poblaciones de *G. p. palpalis* en zonas forestales de Nigeria ([Takken y col., 1986](#)). Su coste en materiales y recursos humanos, es inferior al de las trampas piramidales (**Foto 2**).

En el foco de Kogo se distribuyeron un total de 82 pantallas impregnadas durante 12

meses, en los puntos de mayor riesgo de contacto con el vector. Las pantallas fueron reimpregnadas cada tres meses, y en caso de desaparición o deterioro se sustituyeron por nuevas. La evaluación de la eficacia protectora se llevó a cabo con trampas piramidales. En agosto de 2003 y febrero de 2004, se distribuyeron de manera aleatoria 30 trampas piramidales en el epicentro del foco y se recogieron una semana después. La DA en agosto de 2003 fue de 3,96 y en febrero de 2004 de 2,03. En la primera fase de la estrategia de lucha antivectorial con trampas piramidales la DA en esos mismos meses había sido de 1,07 y 0,57.

En el foco de Mbini se distribuyeron un total de 84 pantallas impregnadas durante 12 meses. Al igual que en Kogo, se reimpregnaron cada tres meses para así asegurar una buena concentración de insecticida sobre el tejido en todos los momentos del año. La evaluación de la eficacia protectora se llevó a cabo en febrero de 2004 con 22 trampas piramidales distribuidas de manera aleatoria en diferentes puntos del epicentro. La DA en febrero de 2004 fue de 1,25 mientras que en la primera fase de la estrategia de control con trampas piramidales, la DA en ese mismo mes había sido de 0,44.



Foto 2. Pantalla impregnada con deltametrina en zona ribereña

La disparidad en los valores observados de DA tras un año de control con pantallas impregnadas, frente a los valores de DA alcanzados tras varios meses de uso de trampas piramidales ha podido deberse a múltiples factores (climatológicos, dinámica de las poblaciones de mosca tsetse). A pesar de todo, se llegó a la conclusión que, al igual que se había observado en estudios similares en países limítrofes ([Chauvet y col., 1980](#)), las pantallas impregnadas se habían mostrado menos eficaces que las trampas piramidales en el control de las poblaciones de mosca tsetse en los dos focos continentales.

5. Aplicación de los Sistemas de Información Geográfica (SIG) al estudio de la transmisión de la tripanosomiasis

En los últimos 20 años, la tecnología aplicada al estudio de los fenómenos espaciales o geográficos ha experimentado un gran desarrollo. La mejora en los sistemas de posicionamiento global, el desarrollo de nuevos y más potentes sensores remotos, el perfeccionamiento de software destinado al procesamiento de imágenes y el desarrollo de los sistemas de información geográfica (en adelante SIG), son algunos de los principales avances en el estudio de los fenómenos espaciales. Sin embargo, la aplicación de esta tecnología al estudio de la epidemiología de las enfermedades infecciosas es relativamente novedosa, y su desarrollo es aún incipiente ([Liebhold y col., 1993](#); [Kitron, 2000](#)).

Puesto que la distribución espacial de las enfermedades transmitidas por vectores está delimitada por la distribución geográfica de los vectores y sus huéspedes vertebrados, los programas de control y vigilancia epidemiológica deberían incorporar el análisis espacial de los diferentes parámetros de transmisión ([Kitron, 1998](#)).

Así, el conocimiento de la variabilidad espacio-temporal de la abundancia y de la distribución poblacional de una especie vectora constituye un aspecto fundamental para garantizar una gestión racional de las estrategias de control vectorial ([Dennis y col., 1998](#); [Hay y col., 1998](#)).

El avance en el análisis espacial de los datos puntuales, potenciado fundamentalmente por el desarrollo de los modelos geoestadísticos, ha permitido cuantificar y modelar patrones espaciales en la distribución de las poblaciones vectoras, principalmente insectos ([Dennis y col., 1998](#); [Gatton y col., 2004](#); [Ryan y col., 2004](#)). Sin embargo, el patrón de distribución espacial de los vectores no siempre se corresponde con la

variabilidad observada en la intensidad de la transmisión. En el caso de la malaria, algunos autores han comprobado que la densidad de mosquitos adultos no siempre está correlacionada con la intensidad de la transmisión y la incidencia de malaria severa ([Beier y col., 1999](#)). Es preciso incorporar otras variables en el modelo para llegar a explicar mejor las diferencias espaciales y temporales en el patrón de transmisión de este tipo de enfermedades. En los últimos años han surgido los mapas de riesgo que incorporan a los modelos espaciales de distribución de los vectores, datos relativos a la epidemiología de la enfermedad, e información climatológica y ambiental ([Kitron, 2000](#)).

La distribución geográfica de la tripanosomiasis africana está ligada a la distribución espacial de la mosca tsetse, aunque la sola presencia del vector no garantiza la transmisión.

Se ha hecho un gran esfuerzo para identificar factores epidemiológicos (parasitológicos y entomológicos), ambientales y humanos que estarían relacionados con la distribución espacial de la enfermedad ([Odiit y col., 2006](#); [Courtin y col., 2005a](#); [Courtin y col. 2005b](#)). Los SIG, en combinación con la información proporcionada por sensores remotos, han permitido identificar factores ambientales asociados a la distribución de las poblaciones de mosca tsetse y la tripanosomiasis ([Rogers y col., 1991](#); [Kitron y col., 1996](#); [Odiit y col., 2006](#)).

En un estudio llevado a cabo en Uganda empleando imágenes Landsat ETM, se concluyó que la proximidad a zonas pantanosas y una baja densidad de población estaban asociadas a la presencia de tripanosomiasis ([Odiit y col., 2006](#)).

En el año 1999, se detectó un brote epidémico de THA (319 casos) por *T. b. gambiense* en la capital de la República Democrática del Congo, Kinshasa (distrito de Kisenso) ([Ebeja y col., 2003](#)). Como consecuencia de este brote, se empezó a especular con la posibilidad de una transmisión urbana, hipótesis que fue descartada pocos años después ([Robays y col., 2004](#)). La mayor parte de los casos diagnosticados en barrios interiores de la capital habían residido en otras provincias donde hay focos de alta transmisión. Sin embargo, en la periferia de Kinshasa, donde han existido focos históricos de tripanosomiasis, la presencia de numerosos cauces fluviales proporciona un hábitat idóneo para la especie ribereña *G. fuscipes quanzensis*. En 2004, a partir de una imagen georeferenciada de la ciudad de Kinshasa (imagen SPOT 4), de datos de distribución y densidad de *G. f. quanzensis*, y de los datos epidemiológicos correspondientes al brote de 1999, se generó un sistema de información. A partir de

este SIG, se encontraron claros indicios de que la transmisión local de la tripanosomiasis había ocurrido en el área peri-urbana, delimitando el área de distribución del vector a las orillas de los cauces principales de la zona rural y peri-urbana ([De Deken y col., 2005](#)).

Por otra parte, los desplazamientos humanos, ya sean voluntarios (actividad económica) o forzados (conflictos bélicos), se convierten en variables de riesgo cuando suponen la inclusión de población en el hábitat del vector ([Laveissière y col., 1986](#); [Simarro y col., 1990](#)). Este factor fue tenido en cuenta en un estudio espacial llevado a cabo en el foco de Bonon, Costa de Marfil. La historia de asentamientos poblacionales en el foco resultó ser la principal causa determinante del patrón de uso del suelo, el cual estaba directamente relacionado con la distribución y densidad del vector en la zona ([Courtin y col., 2005b](#)).

La OMS considera que los principales factores entomológicos relacionados con el riesgo de transmisión de la tripanosomiasis son la densidad de mosca tsetse y la tasa de infección ([OMS, 1986](#)). Basándose en estos principios, algunos autores se han dedicado a generar modelos predictivos de distribución de vectores, a partir de variables ambientales (cobertura del suelo, información climatológica) y ecológicas (distribución de población, presencia de ganado), con el fin de identificar y delimitar áreas de riesgo de transmisión ([Robinson, 1998](#)).

Todos estos ejemplos son una muestra de la contribución de estas nuevas tecnologías de la información espacial, al conocimiento de la transmisión de la tripanosomiasis a nivel local (foco) y regional.

Pero además, debemos hablar de la importancia de la aplicación de estas nuevas tecnologías en las campañas de control vectorial. El desarrollo de los sistemas globales de posicionamiento y navegación (GPS) ha contribuido a mejorar la precisión de las actividades de fumigación aérea (técnicas de aerosol secuencial, SAT) llevadas a cabo en diversos países de África del Sur, como es el caso de Botswana ([Allsopp y Philemon-Motsu, 2002](#)).

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Objetivos generales

1. Analizar la variabilidad espacial y temporal de las poblaciones de mosca tsetse presentes en los focos de Mbini y Kogo durante los años 2004 y 2005, e identificar las zonas de mayor riesgo de contacto con el vector de la tripanosomiasis humana en la zona (*G. p. palpalis*).
2. Evaluar el impacto de las actividades de control con trampas piramidales ([Gouteux y Lancien, 1986a](#)) sobre el contacto hombre-vector.
3. Determinar la frecuencia de infección por tripanosomas en ganado peridoméstico (cabras, ovejas y cerdos) en los focos de Kogo y Mbini, antes de la puesta en marcha de una campaña de control vectorial con trampas.
4. Analizar la relación entre la densidad de mosca tsetse y la infección por tripanosoma en ganado peridoméstico.

Hipótesis

- 1.1. La densidad de las poblaciones de *G. p. palpalis* varía de forma significativa según el ecosistema.
- 1.2. *G. p. palpalis*, principal vector de la tripanosomiasis en África Central, puede mostrar hábitos peridomésticos, siendo posible la transmisión de la infección dentro de los núcleos de población.
- 1.3. Las poblaciones de *G. p. palpalis* tienden a dispersarse durante el periodo de lluvias siguiendo los cauces fluviales. Este comportamiento puede permitir la recolonización desde zonas no controladas.
- 1.4. La localización de las zonas de mayor riesgo de transmisión permite una mejor gestión de las actividades de control vectorial y optimización de recursos.
- 2.1. Las trampas piramidales reducen la densidad de las poblaciones de mosca tsetse ribereñas y, por tanto, son una buena herramienta de control vectorial.
- 3.1. La frecuencia de infección por tripanosomas en ganado peridoméstico, al comienzo de la puesta en marcha de una campaña de control vectorial con

trampas, es alta en los focos de Kogo y Mbini.

- 3.2. Al igual que en otros países de la subregión, las infecciones por *T. brucei* s.l. en mamíferos no humanos son menos prevalentes que las infecciones por otras especies como *T. vivax* o *T. congolense*.
- 3.3. Existe diferencia significativa en la frecuencia de infección por *T. brucei* s.l. entre especies animales.
- 4.1. La prevalencia de infección por *Trypanosoma* sp varía notablemente entre los focos, y está relacionado con la densidad aparente de mosca tsetsé.

III. MATERIAL Y METODOS

1. Área de estudio

La República de Guinea Ecuatorial está formada por dos regiones: una región insular, que incluye las islas de Bioko, Annobón, Elobeyes (Elobey grande y Elobey chico) y Corisco, y una región continental, también conocida como Río Muni, que limita con Camerún al norte, y Gabón al sur y al este (**Figura 7**).

Territorialmente, estas dos regiones a su vez se dividen en 7 provincias que engloban a 18 distritos.

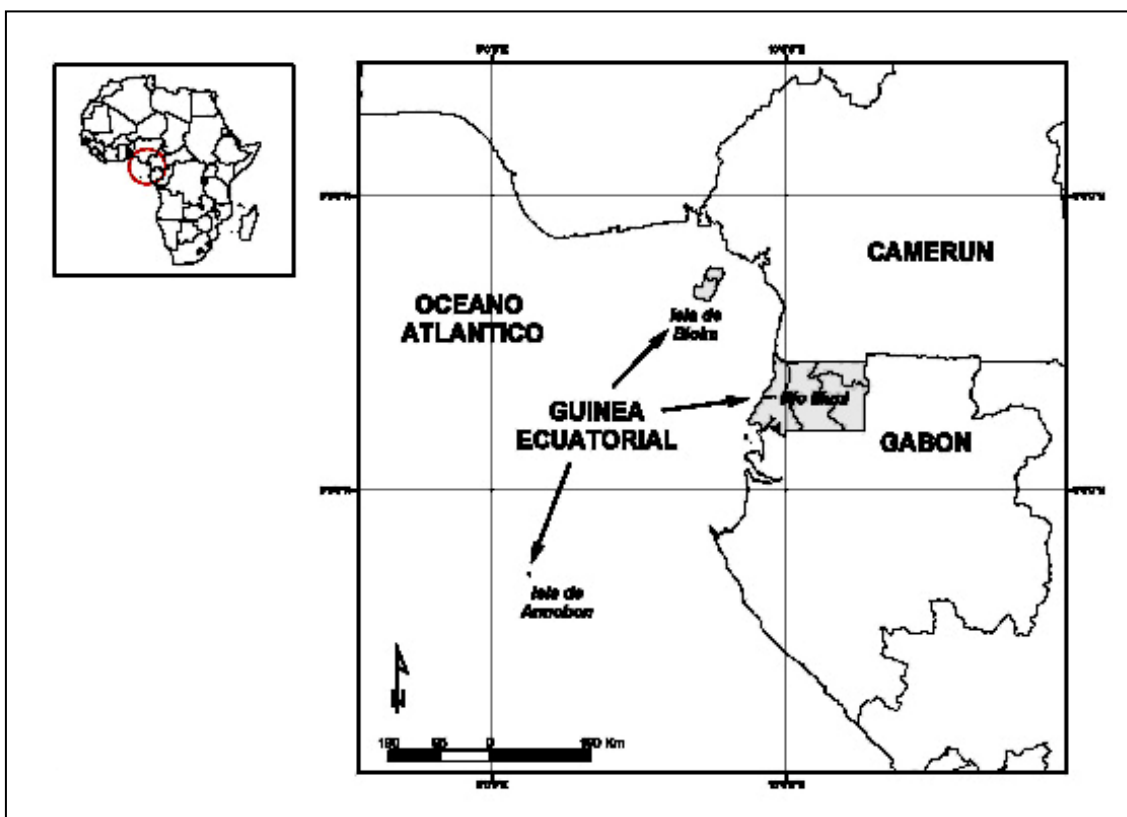


Figura 7. Mapa y situación de la República de Guinea Ecuatorial

La **provincia de litoral**, que recibe este nombre por incluir todo el territorio costero de la región continental, está formada por tres distritos; Bata (donde está ubicada la capital de la región continental), Mbini y Kogo.

La zona litoral, con una altitud media inferior a 200 m, presenta un relieve en el que alternan las mesetas onduladas y las colinas con fuerte pendiente pero con poco desnivel. Más allá del límite de las formaciones del cretácico de la zona litoral, este tipo

de relieve se extiende a la planicie que atraviesa el río Ntem. La costa está formada por una sucesión de cabos (desde la punta Epote, al norte, hasta el cabo San Juan, al sur), que separan ensenadas con grandes curvaturas que dan lugar a largas playas de arena blanca.

Las cuencas vertientes de la zona litoral se distinguen por una densidad de cursos de agua inferior a la del resto de la región continental. Las zonas de estuarios donde se mezclan las aguas dulces con las aguas marinas están muy desarrolladas (río Ntem, Wele y Muni), y presentan márgenes colonizados por manglares también afectados por las mareas.

Los vastos estuarios del río Wele y sobre todo de Río Muni se deben a una invasión del mar, que corresponde a una cuenca subsidente. En cambio, en el resto del litoral, la costa alimentada por las arenas depositadas por las corrientes litorales, retrocede lentamente, dejando al descubierto cordones arenosos recientes y terrazas arenosas de un cuaternario más antiguo. Esta recuperación del mar da lugar al desarrollo de manglares instalados en los limos fluvio marinos, que quedan inmovilizados.



Foto 3. Praderas naturales costeras

En la provincia de litoral predominan la pradera costera, bicoro (maleza y arbustos secundarios a una explotación forestal) y bosque claro. Los cultivos y barbechos recientes y antiguos, que cubren cerca del 20% de la superficie de la región continental, ofrecen un paisaje de recuperación progresiva de la selva en función de la antigüedad del barbecho. Esta recuperación, si no se ve interrumpida por nuevas roturaciones, resulta ser una secuencia de espesuras herbáceas y leñosas, que posteriormente deriva en una selva secundaria con subcapa densa de matorrales y lianas que evolucionan al cabo de 30-40 años hacia una formación forestal relativamente rica en especies maderables.

Aunque de manera minoritaria, cabe destacar la presencia de selvas de *Saccoglottis* en las arenas litorales y las formaciones gramíneas bajas en las terrazas de antiguas arenas marinas.

El mangle (*Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida*) está presente en todas las desembocaduras de ríos, pero se hace especialmente abundante en los ríos Ntem (Río Campo), Utonde (Bata), Ekuku (Bata), río Benito o Wele (Mbini), y en el estuario de Río Muni (Kogo).



Foto 4. Manglar ribereño

En la región continental del país el clima es típicamente ecuatorial. Hay cuatro estaciones: dos secas, una que va desde diciembre hasta mediados de marzo, y otra que transcurre desde julio hasta mediados de septiembre, y dos lluviosas, una más intensa que transcurre desde mediados de septiembre hasta finales de noviembre y otra menos intensa que transcurre desde mediados de marzo hasta finales de junio. La pluviometría anual alcanza los 2.074 mm en 118 días de lluvias. La humedad relativa durante todo el año oscila entre el 70% y el 100%. La temperatura media es de 25°C, con una mínima que varía entre 17°C y 21°C, y una máxima entre 29°C y 30°C, dependiendo de la localización y la estación ([Alvar y col., 1996](#)).

1.1. Foco de Kogo

El distrito de Kogo se encuentra al sur de la provincial de litoral, limitando al norte con el distrito de Mbini, al sur con Gabón, y al este con los distritos de Evinayong y Akurenam.

Según el último censo fiable de Guinea Ecuatorial, realizado por el Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD, 1994), en el distrito de Kogo hay 9.535 habitantes; 4.644 hombres y 4.891 mujeres. Se estima que 812 viven en el área urbana (ciudad de Kogo) y 8.723 en el área rural.

La población del distrito de Kogo vive, en su mayoría, de la pesca artesanal en las aguas del estuario del Muni, y de la explotación de pequeñas fincas (plátano, yuca, banana...). También se practica la caza, fundamentalmente con pequeñas trampas.

La mayor parte de la población se concentra en los poblados distribuidos a lo largo de la carretera que comunica la ciudad de Kogo con Bata y el poblado de Akalayong con la ciudad de Mbini. El resto se distribuye de manera irregular en poblados y "pesquerías" (secaderos de pescado) localizados a orillas de los cauces fluviales que conforman el estuario del Muni (río Congüe, río Mitong, río Mitemele...) (**Figura 8**).

Las pesquerías o secaderos de pescado son ocupados, en la mayoría de los casos, durante los periodos en los que la pesca es más productiva (mareas pequeñas). Algunas de ellas, la mayoría a orillas del río Mitong o cuencas subsidiarias, han acabado por convertirse en auténticos poblados debido a la permanencia continua de la población.

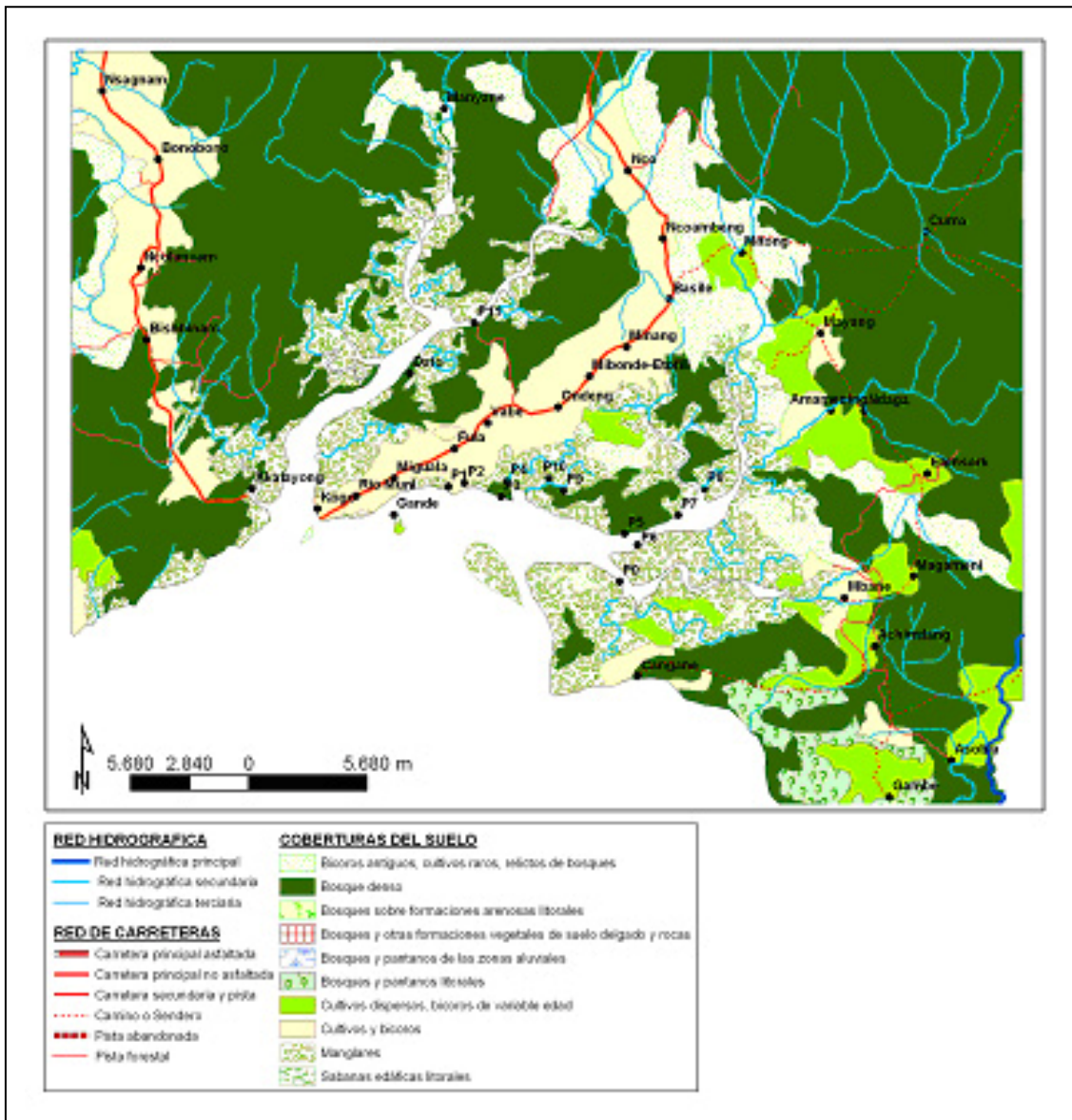


Figura 8. Distribución de los poblados y secaderos en el foco de Kogo

A nivel sanitario, en Kogo hay un hospital localizado en la cabecera del distrito, un centro de salud en el poblado de Bitika (fuera del foco de THA) y puestos de salud en los principales poblados. La mayoría de los puestos están operativos, aunque su funcionamiento es irregular.

A pesar de que el vector está presente en numerosos puntos dentro del distrito de Kogo, en los últimos años la mayoría de los casos de THA se han registrado en los poblados localizados entre los ríos Mitong y Congüe, y sus inmediaciones. Esta área es considerada como de elevado riesgo de transmisión de la THA dentro del distrito (Figura 8).



Foto 5. Secadero de pescado (Ndjonmelen)

1.2. Foco de Mbini

El distrito de Mbini se encuentra en el centro de la provincia de litoral, limitando al norte con el distrito de Bata, al sur con el distrito de Kogo, al noreste con el distrito de Niefang y al este con el distrito de Evinayong.

En el distrito de Mbini hay 11.292 habitantes, 5.353 hombres y 5.939 mujeres (PNUD, 1994). Se estima que 1.920 viven en el área urbana (ciudad de Mbini), y 9.372 en el área rural. La población de Mbini vive del cultivo de pequeñas fincas (agricultura de subsistencia), de la pesca artesanal y de la explotación forestal. La pesca se desarrolla fundamentalmente en el mar, aunque también hay actividad pesquera en el río Wele, principal cauce fluvial.

La mayor parte de la población se concentra en los poblados distribuidos a lo largo de las carreteras que comunican la ciudad de Mbini con Bata y el poblado de Akalayong, en el distrito de Kogo (**Figura 9**).

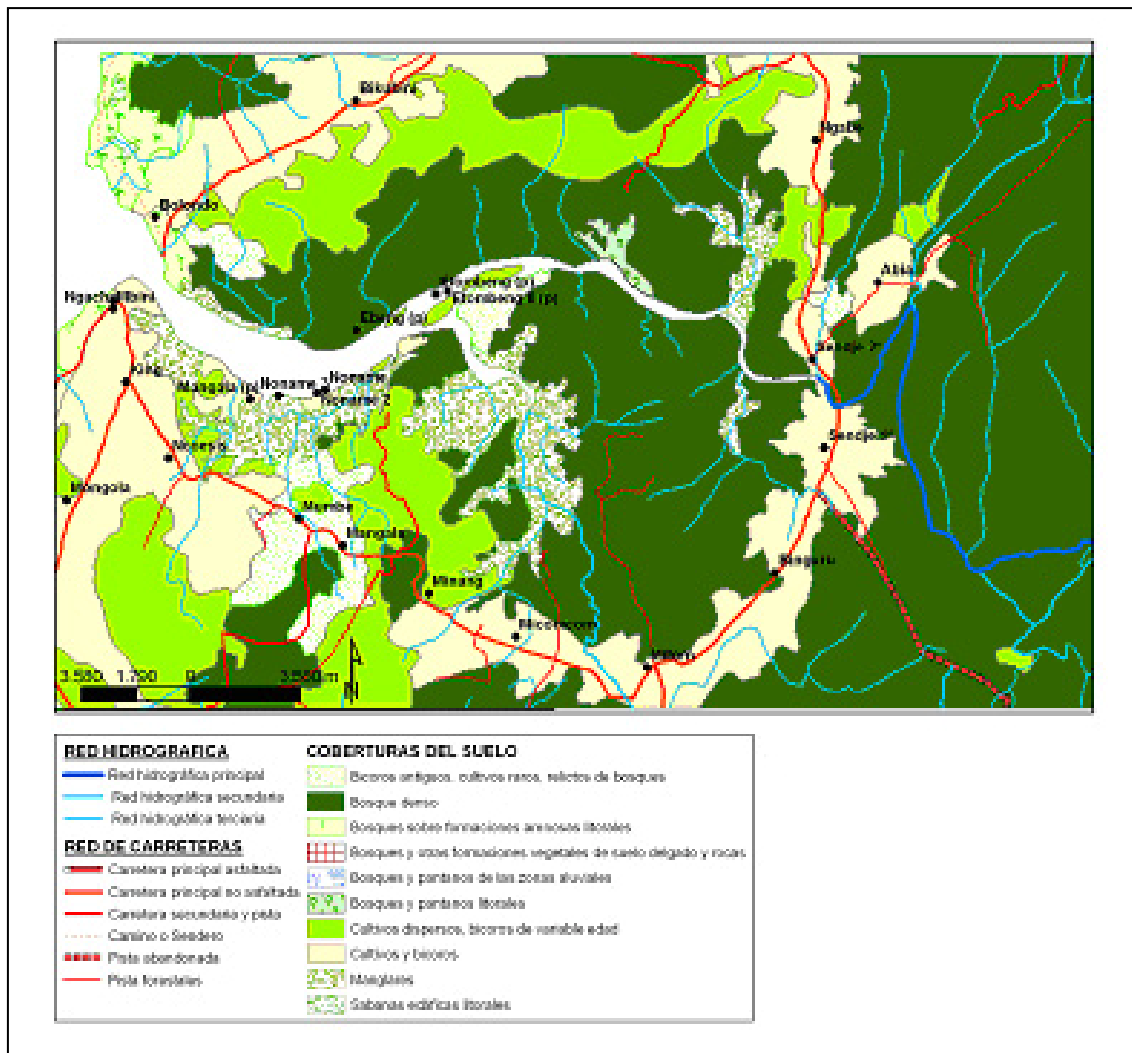


Figura 9. Distribución de los poblados y secaderos en el foco de Mbini

Al igual que en Kogo, en el distrito de Mbini, a orillas del río Wele o Benito, hay secaderos de pescado, aunque son menos importantes en cuanto a actividad pesquera y por tanto, en cuanto a ocupación humana. A nivel sanitario, en Mbini hay un hospital localizado en la cabecera del distrito, un centro de salud en el poblado de Matondo (Milong-Milong) (fuera del foco de THA), y puestos de salud en los principales poblados, en su mayoría operativos pero de funcionamiento irregular, donde se lleva a cabo la atención primaria.

Aunque el vector está presente en numerosos puntos dentro del distrito de Mbini (río Aye, río Ndote, río Etebue...), en los últimos años la mayoría de los casos de THA se han registrado en las localidades ubicadas entre el consejo de poblado de Sendje y el barrio Ndong Nzé (Mbini ciudad), y sus inmediaciones. Esta área es considerada de elevado riesgo de transmisión de la THA dentro del distrito (**Figura 9**).

2. Capturas y control de mosca tsetse

Para el estudio y control de las poblaciones de mosca tsetse de los focos de Kogo y Mbini se seleccionó la trampa mono-piramidal diseñada por Gouteux y Lancien en 1986 ([Gouteux y Lancien, 1986a](#)). Este modelo de trampa ha sido empleada anteriormente con éxito en otros países de África central, incluyendo Guinea Ecuatorial, para el control de *G. p. palpalis* ([Gouteux y Lancien, 1986b](#); [Simarro y col., 1990](#); [Abel y col., 2004](#)). La trampa mono-piramidal es de confección sencilla, poco costosa (aproximadamente 9 \$ USA en 1986) y fácil de transportar. Estas cualidades la hacen ideal para las campañas de control a gran escala (**Fotos 6-8**).

Además, este tipo de trampas son idóneas para evaluar periódicamente la eficacia de la estrategia de control, y para estudiar algunos aspectos del comportamiento y distribución de las glosinas vectoras ([Kuzoe y Schofield, 2004](#)). También se pueden impregnar con insecticida, si únicamente se quieren emplear como herramienta de control.

Para los estudios llevados a cabo en los focos de Kogo y Mbini se incorporó al ápice de las trampas un sistema de recolección de las moscas consistente en una botella recolectora con una solución conservante (solución formol al 5%) (**Foto 9**).



Foto 6. Trampa piramidal en un punto de recogida de agua (Mbini)



Foto 7. Trampa piramidal en un secadero de pescado (Kogo)



Foto 8. *Glossina* sp posada en una trampa piramidal



Foto 9. Botella recolectora con solución formol al 5%

3. Procesamiento de las moscas tsetse

Las trampas piramidales fueron revisadas quincenalmente los dos primeros meses de actividad y mensualmente a partir del tercero. En el terreno, las moscas tsetse fueron contadas y guardadas en etanol absoluto. El resto de artrópodos que fueron cayendo en las trampas se desecharon (**Foto 10**).

En los tubos donde se guardaban las glossinas con etanol absoluto se registró el número de la trampa y la fecha de recolección. Esto permitió determinar, en una segunda fase del estudio, la densidad relativa de glossinas según localización.

En el laboratorio de referencia se llevó a cabo la determinación de especie, mediante la clave de [Brunhes y col. \(1998\)](#), el sexo y un estimador de la edad basado en las lesiones alares (**Foto 11-12**).

Aunque existen métodos más sensibles para determinar la edad de las poblaciones de glossina (disección de ovarios, estudio del saco residual...), debido al elevado volumen de material recolectado se optó por tomar como indicador de la edad las lesiones que exhiben las moscas tsetse en el borde posterior del ala. [Jackson \(1946\)](#) estableció 6 categorías o niveles de degradación del borde del ala, relacionando una mayor

degradación con una mayor edad ([Laveissière y Penchenier, 2000](#)). Según esta clasificación, las moscas tsetsé jóvenes tendrían el borde del ala conservado, sin lesiones alares (G1). La correlación entre el grado de lesión de las alas y la edad fisiológica es bastante variable y depende de las condiciones del medio y de la actividad de los adultos, de manera que los resultados obtenidos deben manejarse con cautela. Para simplificar, se ha empleado una versión modificada de la clasificación de [Jackson \(1946\)](#) en la que se establecen únicamente 4 categorías ([Simarro y col., 1990](#)).

Una vez estudiados los caracteres externos de las glossinas recolectadas, fueron guardadas para posteriores estudios moleculares en grupos de 5 a 10 ejemplares, dependiendo de la especie, en tubos eppendorf de 4 ml en alcohol absoluto y conservados a -20°C.



Foto 10. Recuento de glossinas en el terreno



Foto 11. Determinación de especie y sexo, y estudio de las lesiones alares



Foto 12. Ejemplares de *Glossina palpalis palpalis* (hembras jóvenes)

4. Indicadores entomológicos

Para determinar la eficacia de las trampas piramidales en el control de las poblaciones de mosca tsetsé se estableció como indicador de base y de seguimiento el número de moscas tsetsé capturadas por trampa y día, conocido como **densidad aparente por trampa (DA)**.

En algunos casos, la DA se determinó para cada zona de tratamiento o control. Estas zonas se establecieron teniendo en cuenta el área de influencia de las trampas.

En el estudio llevado a cabo en el foco de Kogo, también se evaluó el impacto del empleo de las trampas piramidales sobre la diversidad de poblaciones de mosca tsetsé y la abundancia relativa de las diferentes especies (equitatividad). Para determinar la diversidad de poblaciones y su variación en el tiempo se trabajó con el índice de Simpson (1949), a menudo empleado en ecología para cuantificar la biodiversidad de un hábitat.

$$\text{Índice de Simpson (D)} = \sum (n/N)^2,$$

donde n sería el número total de individuos de una especie recogidos en un muestreo y N el número total de individuos muestreados.

Este índice de diversidad tendría en cuenta el número de especies presentes (riqueza) y la abundancia relativa de cada una ([Krebs, 1989](#)). Es más frecuente emplear como indicador de la biodiversidad el inverso del índice de Simpson (SDI). El valor resultante oscilará entre 1 y el número de especies presentes en el muestreo (S), que sería el máximo posible de diversidad.

También se determinó la equitatividad (*Evenness*) o uniformidad del muestreo. Este se establece a partir del índice de diversidad de Simpson y el valor de diversidad máximo.

$$E = D/D_{\max} = 1/\sum (n/N)^2 * 1/S$$

Valores cercanos a 0 indicarían un reparto desigual de las capturas o poca variabilidad.

5. Infección por *Trypanosoma* sp en ganado peridoméstico

Recogida de muestras

En junio de 2002 se realizó una encuesta para determinar la frecuencia de infección por *Trypanosoma* sp en ganado peridoméstico de las localidades situadas en el epicentro de los focos de Kogo y Mbini.

Se consiguió estudiar cerca del 80% de los animales censados en la zona. De cada animal se recogió una muestra de sangre (1 ml) en papel de filtro (Whatmann Nº 1 - 4). Las muestras fueron conservadas a 4°C hasta su procesamiento.

Extracción de DNA

La sangre de una porción de papel Whatmann fue extraída añadiendo 1 ml de una solución PBS+0.5% de saponina e incubando durante 1 hora a 37 °C. Después, se centrifugó durante 15' a 14.000 rpm, retirando el sobrenadante resultante, y añadiendo 1 ml de solución PBS a cada tubo. Posteriormente, se llevaron a cabo dos ciclos de incubación a 4 °C durante 20' seguido de 15' de centrifugación a 14.000 rpm. Después de cada centrifugación se procedió a retirar cuidadosamente el sobrenadante y añadir 1 ml de PBS. Se añadió 200 µl de Chelex 5% a cada tubo y tras una rápida agitación, se procedió a incubar a 100 °C durante 10', con un breve agitado en mitad del proceso de incubación. Finalmente, se centrifugó durante 10' a 14.000 rpm, y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf al que previamente se le había añadido 45 µl de acetato sódico y 1 ml de etanol absoluto. La mezcla fue agitada e incubada durante toda la noche a -20 °C. Los tubos fueron centrifugados durante 15' a 14.000 rpm y, el sobrenadante resultante se lavó con una solución de etanol al 70%. Los tubos se centrifugaron, tras una rápida agitación, durante 10' a 14.000 rpm. El pellet fue secado a 37 °C y resuspendido en 15 µl de Tris+EDTA (TE).

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la detección y amplificación de ADN de las diferentes especies de *Trypanosoma* sp se procedió a agrupar ADN extraído a partir de las muestras de sangre animal en grupos de 4. De esta forma se optimizó tiempo y coste. Cuando un grupo (*pool*) resultó positivo, se procedió a analizar individualmente cada una de las muestras del grupo para la discriminación de las muestras positivas.

Se llevó a cabo la amplificación de ADN de diferentes especies de *Trypanosoma* sp mediante la prueba de la *Reacción en Cadena de la Polimerasa* (en adelante RCP) siguiendo el protocolo descrito por [Majiwa y col. \(1994\)](#) para *Trypanosoma congolense* savannah, mientras que para *Trypanosoma congolense* forest se modificaron las condiciones de amplificación descritas por [Masiga y col. \(1992\)](#): desnaturalización a 94°C durante 5 min., seguido de 35 ciclos a 94°C – 11 min., 60°C – 1 min., 72°C – 1 min. y extensión final a 72°C – 5 min. Para *Trypanosoma brucei* s.l. las condiciones de amplificación descritas por [Moser y col. \(1989\)](#) también fueron modificadas:

desnaturalización a 95°C – 1 min., seguido de 40 ciclos de 95°C – 1 min., 55°C – 1 min., 72°C – 1 min., y extensión final a 72°C – 10 min. La amplificación de *Trypanosoma vivax* se llevó a cabo con los iniciadores ILO1265 (*forward primer*) y TVM R (*primer reverse*), diseñados por [Masake y col. \(1997\)](#), y empleando las condiciones descritas por [Morlais y col. \(2001\)](#) (Tabla 2).

Todos los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y fotografiado bajo iluminación ultravioleta.

Especie	Código	Secuencia iniciador	Bp
<i>Trypanosoma congolense</i>	TCF1	5'- GGACACGCCAGAAGGTACTT -3'	350
Forest	TCF2	5'- GTTCTCGCACCAAATCCAAC -3'	
<i>Trypanosoma congolense</i>	TCS1	5'- CGAGCGAGAACGGGCAC -3'	316
Savannah	TCS2	5'- GGGACAAACAAATCCCGC -3'	
<i>Trypanosoma brucei s.l.</i>	TBR1	5'- CGAATGAATATTTAAACAATGCGCAGT -3'	177
	TBR2	5'- AGAACCATTTATTAGCTTTGTTGC -3'	
<i>Trypanosoma vivax</i>	ILO1265	5'- CGCTACCACAGTCGCAATCGTCGTCTCAAGG -3'	400
	TVM R	5'- CAGCTCGGCGAAGGCCACTTGGCTGGGGTG -3'	

⁽¹⁾Tamaño especie-específico

Tabla 3. PCR para detección de *Trypanosoma* sp y secuencias de iniciadores

6. Análisis estadístico

Mediante pruebas no paramétricas (test Mann-Whitney, test Kruskal-Wallis) se ha analizado la variabilidad estacional y anual de la DA para cada especie y el impacto de la estrategia de control sobre la diversidad de poblaciones de mosca tsetsé. En todos los casos, se consideró diferencia estadísticamente significativa valores de probabilidad inferiores a 0,05.

En el estudio llevado a cabo en el foco de Mbini se han identificado las zonas (nicho ecológico) donde el riesgo de contacto con *G. p. palpalis* es más alto. Para ello, se establecieron 6 categorías diferentes de hábitat o nicho ecológico donde esta especie puede estar presente: 1) charca-laguna, 2) pozo, 3) embarcaderos tipo I (en afluentes

secundarios), 4) pequeños ríos, 5) embarcaderos tipo II (en río Wele), y 6) secaderos de pescado. También se emplearon pruebas no paramétricas para analizar el riesgo de contacto con *G. p. palpalis* según biotopos (nicho ecológico).

Se empleó la regresión logística para el cálculo de las razones de Odds (OR) de la distancia y DA de la trampa más próxima a cada una de las localidades de estudio, y la especie animal, como potenciales factores predictores de la infección por *Trypanosoma* sp. Se consideró diferencia estadísticamente significativa valores de probabilidad inferiores a 0,05. Teniendo en cuenta que las poblaciones de *G. p. palpalis* pueden llegar a desplazarse hasta 3 Km desde sus lugares de cría ([Nash, 1953](#)), se excluyeron del análisis aquellas localidades que tenían trampas colocadas a una distancia mayor de este límite de dispersión.

7. Análisis espacial

Se registró la localización geográfica (longitud y latitud) de todas las trampas piramidales empleando un receptor GPS (GPS Garmin© 70S Map). A partir de esta información, y con la base cartográfica, correspondiente a las zonas de estudio, proporcionada por el Instituto de Desarrollo y Promoción Forestal de Guinea Ecuatorial (INDEPROF), se ha desarrollado un SIG para el análisis espacial de los parámetros entomológicos estudiados.

A partir de este SIG, se calculó la distancia Euclidiana (distancia lineal) de cada una de las trampas al poblado más cercano donde se analizó la infección por tripanosoma en ganado peridoméstico. Esta nueva variable se incluyó en los análisis realizados.

Generación de modelos predictivos de la DA estacional y anual

Existen diversos métodos de interpolación espacial (determinísticos y geoestadísticos) para generar superficies de predicción a partir de la información recogida en muestreos puntuales. El *kriging* es un método de predicción espacial geoestadístico que incorpora un modelo de la covarianza de la función aleatoria y emplea la interpolación de una media ponderada móvil para generar la predicción espacial lineal óptima ([Cressie, 1991](#)). Por tanto, para llevar a cabo la predicción de un valor en una determinada localización, el *kriging* tiene en cuenta la estructura espacial de todos los datos medidos (variograma) y los valores de los puntos de muestreo circundantes.

$$Z(s) = \mu(s) + \varepsilon(s),$$

donde $Z(s)$ sería la variable de interés que se descompone en una tendencia determinística $\mu(s)$ y un error aleatorio autocorrelacionado $\varepsilon(s)$. El símbolo "s" haría referencia a una posición (x,y) en el espacio. El planteamiento básico del *kriging* es considerar la estimación de $Z(s)$ como una combinación lineal de las observaciones disponibles.

El *kriging* ordinario no tiene en cuenta la tendencia, y la considera constante y desconocida en todo el modelo ($\mu(s) = m$), mientras que en el *kriging* universal la tendencia se puede ajustar a una función determinística (polinomial).

Se utilizó el *kriging* ordinario y el universal para estimar la DA anual y estacional de *G. p. palpalis* en todo el epicentro del foco de Mbini para los años 2004 y 2005. Se analizaron las posibles tendencias en la distribución espacial de los datos y se estudió la direccionalidad (anisotropía) en la autocorrelación espacial de los valores de DA recogidos, incluyéndose en el modelo cuando se consideró que mejoraban la predicción. El análisis fue llevado a cabo empleando la extensión *Geostatistical Analyst* que incorpora el software ArcGIS 9.1.

Validación de los modelos predictivos

Para determinar la fiabilidad de las estimaciones proporcionadas por las superficies de predicción se empleó un método de validación cruzada. Este método consiste en llevar a cabo tantas interpolaciones como mediciones entran en el modelo, sacando en cada proceso el valor de medición de una de las trampas y comparando, mediante un análisis de regresión lineal, la correlación que existe entre el valor medido (observado) y la predicción generada para ese punto a partir del resto.

Como consecuencia de esta validación cruzada se obtiene una serie de parámetros que determinan la calidad de la predicción: la media y promedio estándar del error de predicción, el error cuadrático medio (en adelante MSE) y el error cuadrático medio estandarizado (en adelante SMSE). Para considerar que un modelo proporciona una buena predicción, la media del error de predicción debe ser cercana a 0, el MSE y promedio estándar del error lo más pequeño posible, y el SMSE cercano a 1.

IV. RESULTADOS

1. Spatial and temporal variability of the *Glossina palpalis palpalis* population in the Mbini focus (Equatorial Guinea)

Jorge Cano, Miguel Angel Descalzo, Nicolas Ndong-Mabale, Pedro Ndong-Asumu, Leonardo Bobuakasi, Jesús N Buatiché, Sisinio Nzambo-Ondo, Melchor Ondo-Esono, Agustin Benito y Jesus Roche

Enviado al *International Journal of Health Geographics* (BioMed Central) el 6/02/2007, revisado el 19/04/2007 y aceptado para publicación el 27/07/2007

International Journal of Health Geographics 2007, **6**:36

<http://www.ij-healthgeographics.com/content/6/1/36>

2. Predicted dispersion and movement of *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Glossinidae) in the wet and dry seasons in the Kogo trypanosomiasis focus (Equatorial Guinea)

Jorge Cano, Miguel Angel Descalzo, Nicolas Ndong-Mabale, Pedro Ndong-Asumu, Leonardo Bobuakasi, Jesús N Buatiché, Sisinio Nzambo-Ondo, Melchor Ondo-Esono, Agustin Benito y Jesus Roche

Enviado al *Journal of Vector Ecology* el 13/02/2007, revisado el 21/04/2007 y aceptado para publicación el 5/06/2007.

Journal of Vector Ecology 2007, **32(2)**: 218-225

3. High *Trypanosoma spp* infection in peridomestic livestock and the relation with the apparent density of tsetse flies in two endemic foci in Equatorial Guinea

Jorge Cano, Filipa Ferreira, Miguel Angel Descalzo, Nicolas Ndong-Mabale, Pedro Ndong-Asumu, Agustin Benito, Jesus Roche, Virgilio do Rosario y Sonia Centeno-Lima

Enviado al *Parasites & Vectors* el 21/04/2008.

1. Variabilidad espacial y temporal de las poblaciones de *Glossina palpalis palpalis* en el foco de Mbini (Guinea Ecuatorial)

Resumen

La Tripanosomiasis Humana Africana es una enfermedad parasitaria transmitida por un vector hematófago. La distribución geográfica de la enfermedad está ligada a la distribución espacial de la mosca tsetsé.

En el marco de una campaña de control vectorial empleando trampas, se analizó la variabilidad espacial y temporal de las poblaciones de glossina presentes en un foco endémico de enfermedad del sueño de Guinea Ecuatorial, el foco de Mbini.

Se registró una caída brusca del promedio anual de densidad aparente de *Glossina palpalis palpalis* del año 2004 al 2005, aunque no se observaron diferencias entre estaciones climáticas. El riesgo de contacto con *G. p. palpalis* varía significativamente de un biotopo a otro. Los secaderos de pescado son los puntos donde se observaron las densidades del vector más altas, aunque el riesgo de contacto con *G. p. palpalis* cayó significativamente del 2004 al 2005 en todas las zonas.

A pesar de que la densidad de mosca tsetsé es relativamente baja en secaderos de pescado y embarcaderos, la población que trabaja y vive en estas zonas estaría más expuesta a la enfermedad. En el foco de Mbini, se ha demostrado la utilidad de las trampas piramidales en el control de las poblaciones de *G. p. palpalis*, aunque debe intensificarse la actividad en las orillas de la principal cuenca fluvial, el río Wele. Las técnicas de análisis espacial y sistemas de información geográfica han mostrado ser de gran utilidad para discriminar zonas donde el riesgo de transmisión de la tripanosomiasis es más alto.

Spatial and temporal variability of the *Glossina palpalis palpalis* population in the Mbini focus (Equatorial Guinea)

Jorge Cano^{1§}, Miguel Angel Descalzo¹, Nicolas Ndong-Mabale^{2,3}, Pedro Ndongo-Asumu³, Leonardo Bobuakasi², Jesús N Buatiché², Sisinio Nzambo-Ondo², Melchor Ondo-Esono², Agustin Benito¹ and Jesus Roche¹

¹National Centre of Tropical Medicine. Instituto de Salud Carlos III. C/ Sinesio Delgado 6, 28029. Madrid. Spain.

²National Centre of Endemic Control. Instituto de Salud Carlos III. Bata, Equatorial Guinea.

³National Sleeping Sickness Control Programme. Ministry of Health and Social Welfare. Bata, Equatorial Guinea.

[§]Corresponding author

Email addresses:

JC: jcano@isciii.es

MAD: madescalzo@isciii.es

NNM: tha@wanadoo.gq

PNA: ndongoasumu@yahoo.com

LB: paludismo@wanadoo.gq

JNB: paludismo@wanadoo.gq

SNO: sisinio_nzambo@hotmail.com

MOE: melchor_ondo@hotmail.com

AB: abenito@isciii.es

JR : jroche@isciii.es

Abstract

Background

Human African Trypanosomiasis is a vector-borne parasitic disease. The geographical distribution of the disease is linked to the spatial distribution of the tsetse fly. As part of a control campaign using traps, the spatial and temporal variability is analysed of the glossina populations present in the Mbini sleeping sickness focus (Equatorial Guinea).

Results

A significant drop in the annual mean of the *G. p. palpalis* apparent density was noted from 2004 to 2005, although seasonal differences were not observed. The apparent density (AD) of *G. p. palpalis* varies significantly from one biotope to another. The fish dryers turned out to be zones with the greatest vector density, although the AD of *G. p. palpalis* fell significantly in all locations from 2004 to 2005.

Conclusions

Despite the tsetse fly density being relatively low in fish dryers and jetties, the population working in those zones would be more exposed to infection. The mono-pyramidal traps in the Mbini focus have been proven to be a useful tool to control *G. p. palpalis*, even though the activity on the banks of the River Wele needs to be intensified. The application of spatial analysis techniques and geographical information systems are very useful tools to discriminate zones with high and low apparent density of *G. p. palpalis*, probably associated with different potential risk of sleeping sickness transmission.

Background

Over the last 20 years, great leaps forward have been made in the study of geographical or spatial phenomena. Improvements to global positioning systems (GPS), the development of new and more powerful remote sensors, better image processing software and new geographical information systems (GIS) are some of the main advances in the study of spatial phenomena. However, the application of this technology to the study of infectious disease epidemiology is relative new and is still in its earliest stages [1,2].

Given that the spatial distribution of vector-borne diseases is demarcated by the geographical distribution of the vectors and their vertebrate hosts, the control programmes and epidemiological surveillance should include the spatial analysis of the different transmission parameters [3].

Therefore, knowledge of the spatial-temporal variability in vector abundance and distribution is fundamental to guaranteeing rational management of the vector control strategies [4,5].

Progress in the spatial analysis of point patterns, fundamentally driven by the development of geo-statistical models, has led to the spatial distribution of vector populations, principally insects, being quantified and modelled [4,6,7]. However, the spatial distribution of vectors does not always tally with the differences in the intensity of the transmission. In the case of malaria, some authors have established that the density of adult mosquitoes does not always correlate with the transmission intensity and incidence of severe malaria [8]. Other variables need to be included in the model so that the spatial and temporal differences in the transmission pattern of this type of disease can be better explained. Over recent years, risk maps have emerged that include data relating to the disease epidemiology, environmental and climatology information in the vector distribution spatial models [2].

Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness, is a vector-borne parasitic disease. The parasites are transmitted to humans by the tsetse fly (Diptera: Glossinidae), which is found in Sub-Saharan Africa. The geographical distribution of the disease is linked to the spatial distribution of the tsetse fly, even though transmission does not only occur by the presence of the vector.

Great emphasis has been placed on identifying human, environmental and epidemiological (parasitological and entomological) factors that would be related to the

spatial distribution of the disease [9-11]. Geographical information systems, combined with information provided by remote sensors, have enabled environmental factors associated to the distribution of the tsetse fly populations and trypanosomiasis to be identified [9,12,13]. During a study conducted in Uganda using Landsat ETM images, it was concluded that the presence of cases of trypanosomiasis was associated with proximity to swampy zones and a sparsely populated areas [9].

In the same way, human displacements, whether voluntary (economic reasons) or forced (wars and conflicts), become risk variables when the population moves into the habitat of the vector [13-15].

The tsetse fly density and the infection rate are the main entomological factors related to the transmission risk [16]. Based on this, some authors consider that distribution vector prediction models can be used to identify and demarcate transmission risk areas. The distribution and density of potential hosts (human or animals) and land cover were taken into account when generating those models [17].

In Equatorial Guinea, four trypanosomiasis foci are described: an insular focus, which is being eliminated [18] and 3 continental foci [19], active but with a low case incidence [20]. In the four foci, *Glossina palpalis palpalis* has been identified as the main vector of the disease [15]. The initial phase of vector control was carried out in the Luba insular focus in 1985. These studies determined the distribution and density of *G. p. palpalis* and assessed the effectiveness of the mono-pyramidal traps as a control strategy [15]. In 2002, a vector control programme was implemented based on the use of traps in the Kogo and Mbini continental foci. At the beginning of control campaign, global apparent density (AD) in Mbini focus was 4.19 tsetse flies/trap/day.

The objectives of this study are to analyse the spatial and temporal variability of the glossina populations present in the Mbini foci during 2004 and 2005, and identify the zones with higher apparent density of tsetse flies. Furthermore, the impact of control activities is assessed.

Results

Between July 2004 and December 2005, a total of 7,361 *glossinae* was caught; 5,470 (74.3%) *Glossina palpalis palpalis*, 1,606 (21.8%) *Glossina tabaniformis* and 285 (3.9%) *Glossina caliginea*. During that period, a monthly average of 65 traps was operative, while the remainder had broken or had fallen at the time of being checked.

A greater number of disappeared, broken and fallen traps were recorded during the rainy season, fundamentally in villages where greater resistance was noted among the population towards the control activities.

The global AD in July 2004 was 0.33 tsetse/trap/day, reached a minimum of 0.06 in January 2005 and was then progressively increased until it hit 0.29 in December (Figure 1).

Table 1 sets out the mean AD (MAD) data for the three species by season and year. The MAD for *G. p. palpalis* in the Mbini focus during the 2004 dry season was 0.39 (sd: 0.39), which fell to 0.31 (sd: 0.26) during the rainy season (Mann-Whitney test, $p=0.473$). The following year, the MAD was 0.17 (sd: 0.24) in the dry and 0.21 (sd: 0.26) in the rainy season ($p=0.09$). A significant drop in the annual MAD was noted, from 0.35 (sd: 0.33) in 2004 to 0.19 (sd: 0.25) in 2005, for this species, despite the recovery recorded during the last quarter of 2005.

A significant drop in the annual MAD was noted for *G. tabaniformis*, but not between seasons for the second year of activity ($p=0.664$). In the case of *G. caliginea*, the MAD values were very low in the two-year study period, with no seasonal or annual differences being noted.

The MAD for *G. p. palpalis* varies significantly from one zone to another (Kruskal-Wallis test, $p<0.05$). When analysing the differences between locations, it notes that the annual MAD for *G. p. palpalis* in 2004 was significantly higher in the fish dryers (MAD: 0.41, sd: 0.38) than in wells, ponds-pools, type I jetties and small rivers. There were no significant differences with respect to the type II jetties. In that year, the zones with lower MAD were the type I jetties, with a MAD equal to 0.13 (sd: 0.26) (Figure 2).

After a year of using mono-pyramidal traps, the differences between locations changed. The fish dryers continued to be points with the highest AD for sleeping sickness vector (MAD: 0.22, sd: 0.29), even though no significant differences were noted with respect to the type I jetties ($p=0.111$). The pond-pools became the zones with the lowest AD, with an MAD equal to 0.04 (sd: 0.13).

The AD of *G. p. palpalis* fell significantly from 2004 to 2005 in all locations except for the type I jetties ($p=0.504$) (Figure 2).

Table 2 sets out the total catches and seasonal MAD of *G. p. palpalis* according to the location and season. Significant seasonal differences were only noted in tributaries

(small rivers) during the second control year.

Table 3 sets out the quality of the best simulations performed of the prediction surfaces of the annual and seasonal AD for *G. p. palpalis* and the main descriptive parameters of each model.

G. p. palpalis MAD in the Mbini focus is low and the distribution homogeneous, probably consequence of the outcome of the vector control carried out since 2002 (Figures 3 to 5). The 2004 prediction model reveals a zone where the density of *G. p. palpalis* is much higher (MAD: 0.25 to 0.5), a zone close to the estuary of the River Wele and tributaries. The density of this vector species decreases as the distance increases from the main waterway. In 2005, after one control year using mono-pyramidal traps, the *G. p. palpalis* population dropped notably throughout the focus. MAD values of between 0.25 and 0.5 were only maintained in the upper reaches of the river (Figure 3).

If the model generated for the seasonal AD is analysed, differences can be seen in the distribution of the *G. p. palpalis* population densities between the rainy and dry season. During the 2004 dry season, the highest *G. p. palpalis* densities (DAP > 0.5) were noted at some points of the focus epicentre (between King and Ncoesis locations) and the upper reaches of the River Wele. During the rainy season, a similar distribution pattern to the dry season was noted, even though the MAD fell significantly in the aforementioned zones.

The lowest *G. p. palpalis* distribution was recorded in the 2005 dry season (DAP < 0.5), with a completely homogeneous distribution (Figure 4). During the rainy season of that same year, a recovery in the vector populations was noted, particularly in the upper reaches of the River Wele and tributaries, even though densities under 0.5 *G. p. palpalis*/trap/day continued to be recorded in the focus epicentre (Figure 5).

The difference between the 2004 and 2005 AD prediction surfaces provides an estimate of the impact of the mono-pyramidal traps on the man-vector contact. Thus, for the whole interpolation area, from one year to another, the *G. p. palpalis* AD has fallen by an average of 0.13 (sd: 0.06).

Discussion

The apparent density of *G. p. palpalis* in the Mbini focus during the study period was low as a result of the control activity that had been carried out since 2002. During the

first months of the study, the number of catches dropped sharply, even though at the end of the second year, a progressive recovery of the *G. p. palpalis* populations was noted (Figure 1). The increase in the number of disappeared, broken or fallen traps, mainly in villages where there was greatest resistance among the population towards the control activities, could be one of the reasons for this recovery. The sharp drop in the number of operative traps (from 0.15 to 0.10 traps per km²) took place halfway through the second year of study and was attributed to the immigration of citizens that arrived from non-endemic areas, who were not highly aware of the disease and control strategies. Therefore, it is essential to raise awareness among Mbini inhabitants and involve the communities in the vector control activities, which must always be supervised and checked by qualified workers [21].

On the other hand, as Figure 5 shows, the recovery began in the upper reaches of the River Wele, considered to be a low transmission risk due to the lack of human settlements. The percentage of mono-pyramidal traps located in the zone was low (30.5%), compared to those to be found at the sites in the focus epicentre.

In general, the trap density is considered to be determined by the abundance of tsetse flies and by the dispersion capacity of the species to be found in the zone [21]. Nash (1953) noted that the *G. p. palpalis* populations may travel up to 3 km from their breeding grounds [22] and that during the rainy period the dispersion of the populations is frequent along the waterways [23]. This behaviour would allow the spreading and re-colonization from untreated zones or with less pressure (lower trap density), aspects that were not taken into account when introducing the mono-pyramidal traps in Mbini. This has likely contributed to the fish dryers and jetties being the areas with the highest *G. p. palpalis* densities, even after the traps had been operative for a year. These zones are characterised for the predominance of the mangrove (*Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida*) and riverbank forest, an ideal habit for this trypanosomiasis vector in Central Africa [24].

Emigration towards unpopulated areas implies a series of changes to the ecosystems that can foster the movement (withdrawal) of the tsetse fly populations [9]. Morris (1951) noted that a habitat reduction of the tsetse fly, particularly due to the elimination of the riverbank vegetation, can lead to a sustained reduction of the risk of infection [25]. However, the population movements, such as those arising from an economic activity, become a risk factor when they involve people entering into the natural habitat of the vector [11,14]. During the studies carried out in the Luba insular

focus, Equatorial Guinea, a great incidence of cases was noted in the adult population that worked in cocoa plantations, the *G. p. palpalis* habitat on the island [15]. Therefore, despite the tsetse fly density being relatively low in fish dryers and jetties, the population that works in these zones (mainly fishermen) could be more exposed to infection.

The application of data interpolation and extrapolation techniques for the study of the spatial distribution of vector species should be performed with caution. The inappropriate use of these techniques may sometimes lead to more information, which is erroneous in many cases, being generated, than that provided by the data itself [2]. The prediction, or probabilistic, models obtained using these techniques represent the change of referenced spatially point observations, on a continuous surface area where the variable of interest is estimated for non-sampled location [26]. In order to apply these interpolation techniques (fundamentally *kriging*), the spatial structure of the data must be analysed and characterised beforehand [7].

The distribution of the traps was not random and was not carried out according to uniformity and spatial representativeness criteria. The uniform distribution of the sampling sites results in better data spatial variability being gathered and notably improves the quality of the estimates [7]. Therefore, the interpolation error will be greater the further the distance from the zones where the sampling is concentrated. In addition, the maximum autocorrelation distance of the data should be taken into account to establish the interpolation distance. These factors must be taken into account when interpreting the prediction maps. Therefore, the use of traps to establish and monitor the spatial pattern of vector distribution may require different distribution criteria than those used to control the vector populations, particularly when spatial analysis tools, such as the *kriging*, are going to be applied.

Despite the above, as can be seen in Table 3, the quality of the prediction surfaces of the annual and seasonal AD for *G. p. palpalis* is, in general, good, particularly for the second year of study.

Conclusions

The mono-pyramidal traps in the Mbini focus have been proven to be a useful tool to control *G. p. palpalis*, even though the activity on the banks of the River Wele,

including the unpopulated zones, needs to be intensified. Thus, the potential risk of infection for the temporary population in the zone would be reduced and recolonizations in the controlled areas would be avoided.

The application of spatial analysis techniques and the development of a geographical information system have allowed to study the distribution and dynamics of the *G. p. palpalis* populations in the Mbini focus, and they have been proven to be useful tools to discriminate zones with high and low AD of HAT vector, probably associated with different potential risk of sleeping sickness transmission.

Methods

Study area

Mbini is just a few kilometres from the capital of the continental region, Bata. In the Mbini district, there are 11,292 inhabitants, out of which 53% (5,939) are women. It is estimated that 83% (9,372) of the inhabitants live in rural areas. The population of Mbini lives off smallholdings (subsistence farming), artisanal fisheries and forestry. The fishing is fundamentally off the coast, even though fishing also takes place on the River Wele, the main waterway (Figure 6). The country's mainland region has a typically equatorial climate. Two dry seasons (December-March, June-September) and two rainy seasons (March-June, September-December) alternate. The annual rainfall amounts to 2074 mm over 118 rainy days. The annual relative humidity ranges between 70% and 100%. The average temperature is 25 °C, with a minimum of 17°C and a maximum of 30°C. Local data about rainfall, average temperature and relative humidity per seasons and years is unavailable in Equatorial Guinea.

Tsetse flies collection and processing

In June 2004, 72 mono-pyramidal traps supplied by Veestergaard-Frandsen®, were placed in zones considered to have a high transmission risk, water points in sites where cases of trypanosomiasis has been diagnosed over the last 5 years. Taking into account that the study area has a total surface of 473.04 km², the density of traps was 0.15 traps per km². From the beginning of the control activities (2002), the same number of traps and locations point has been maintained.

The mono-pyramidal trap [27] was used, which as it includes a system to collect and

conserve the tsetse flies (collection bottle with 5% Formalin solution), means it can be used to determine and monitor the entomological parameters, such as the apparent density. Furthermore, this type of traps has proven to be highly effective in controlling the tsetse fly populations [15,27,28]. The traps were checked every two weeks during the two first months of activity and monthly after the third. In the field, the tsetse flies were counted and preserved in absolute ethanol. Subsequently, the Brunhes J et al (1998) key was used to determine the species in the reference laboratory [29].

Statistical Analysis

The apparent density per trap (AD), number of flies caught per trap and day, was established as the base and monitoring indicator in order to determine the effectiveness of the pyramidal traps in controlling the tsetse fly populations.

Furthermore, the apparent density of *G. p. palpalis* was calculated for each habitat identified as a high contact risk zone: pond-pools (7 traps), wells (10), type I jetties (in secondary tributaries) (4), small rivers (29), type II jetties (on River Wele) (9), and fish dryers (13).

Using non-parametric tests (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test), the variability of the AD for each *glossina* species was analysed in terms of years and climatic seasons, and the AD of *G. p. palpalis* according to biotopes was studied. In all cases, values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Spatial analysis

The geographical location (longitude and latitude) of all the pyramidal traps was recorded using a GPS receiver. Using this information and the maps for the study zone provided by the INDEPROF (Institute of Forestry Promotion and Development, Equatorial Guinea), a GIS was developed for the spatial analysis of the studied entomological parameters.

In order to generate prediction surfaces, based on the information collected in detailed sampling, spatial interpolation methods, geostatistical or deterministic, were used. Kriging is a geostatistical method that includes a covariance model of the random function and uses the interpolation of a weighted moving average to generate the optimal spatial linear prediction [30],

$$Z(s) = \mu(s) + \varepsilon(s),$$

where $Z(s)$ would be the variable of interest that is composed by a deterministic trend $\mu(s)$ and an autocorrelated random error $\varepsilon(s)$. The symbol "s" refers to a location (x,y) in space. The basic kriging approach is to consider the estimate of $Z(s)$ as a linear combination of the available observations.

The *ordinary kriging* does not take into account the trend, and considers it to be constant and unknown throughout the model ($\mu(s) = m$), while the trend in the universal kriging can be adjusted to a polynomial function.

The *ordinary kriging* and the *universal kriging* were used to estimate the annual and seasonal AD of *G. p. palpalis* throughout the epicentre of the Mbini focus for 2004 and 2005. The possible trends in the spatial distribution of the data were analysed and the directionality (anisotropy) in the spatial autocorrelation of the collected AD values was studied, and were included in the model when it was considered that they improved the prediction. The analysis was conducted using the *Geostatistical Analyst* extension included in the ArcGIS 9.1 software.

Validation of the prediction models

In order to determine the reliability of the estimates provided by the prediction surface areas, a crossed validation method was used. This method consists in carrying out as many interpolations and measurements as in the model. In each process, the measurement value of one of the traps was produced and using a linear regression analysis, the correlation that exists between the mean value (observed) was compared to the prediction generated for that point with the rest.

As a result of this crossed validation, a series of parameters was obtained that determined the quality of the prediction: the mean and the mean standard prediction error, the mean square error (MSE) and the standardised mean square error (SMSE). In order for a model to be considered as providing a good prediction, the mean prediction error must be near to 0, the MSE and mean standard prediction error as small as possible, and the SMSE near to 1.

Authors' contributions

JC was involved in the design of the survey, performed the GIS model and spatial analysis, participated in the collection of tsetse flies and the interpretation of statistical

analysis, and coordinated the draft of the manuscript. MAD performed the statistical analysis and drafted the manuscript. PNA was involved in designing the study and approved the version to be published. NNM, SNO, LB, JNB, MOE participated in the collection and identifications of tsetse flies. AB and JR participated in the design of the study and approved the version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank the National Sleeping Sickness Control Program, the Republic of Equatorial Guinea's Ministry of Health and Social Welfare, and the Institute of Forestry Promotion and Development (INDEPROF) for its technical support during the study. This study was funded by the Spanish International Cooperation Agency (AECI) and the Instituto de Salud Carlos III within the Network of Tropical Diseases Research Centers (RICET-RD06/0021).

References

1. Liebhold AM, Rossi RE, Kemp WP: **Geostatistics and geographic information systems in applied insect ecology.** *Ann Rev Entomol* 1993, **38**: 303-327.
2. Kitron U: **Risk maps: transmission and burden of vector-borne diseases.** *Parasitol Today* 2000, **16**: 324-325.
3. Kitron U: **Landscape ecology and epidemiology of vector-borne diseases: tools for spatial analysis.** *J Med Entomol* 1998, **35**: 435-445.
4. Dennis DT, Nekomoto TS, Victor JC, Paul WS, Piesman J: **Reported distribution of *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the United States.** *J Med Entomol* 1998, **35**: 629-638.
5. Hay SI, Snow RW, Rogers DJ: **From predicting mosquito habitat to malaria seasons using remotely sensed data: practice, problems and perspectives.** *Parasitol Today* 1998, **14**: 306-313.
6. Gatton M, Kelly-Hope L, Kay B, Ryan P: **Spatial-temporal analysis of Ross River virus disease patterns in Queensland, Australia.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **71**: 629-635.

7. Ryan P, Lyons SA, Alsemgeest D, Thomas P, Kay BH: **Spatial statistical analysis of adult mosquito (Diptera: Culicidae) counts: an example using light trap data, in Redland Shire, southeastern Queensland, Australia.** *J Med Entomol* 2004, **41**: 1143-1156.
8. Beier JC, Killeen GF, Githure JI: **Entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria.** *Am J Trop Med Hyg* 1999, **61**: 109-113.
9. Odiit M, Bessell PR, Fèvre EM, Robinson T, Kinoti J, Coleman PG, Welburn SC, McDemott, Woolhouse MEJ: **Using remote sensing and geographic information systems to identify villages at high risk for *rhodesiense* sleeping sickness in Uganda.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006, **100**: 354-362.
10. Courtin F, Jamonneau V, Oké E, Coulibaly B, Oswald Y, Dupont S, Cuny G, Doumenge JP, Solano P: **Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Côte d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system.** *Int J Health Geogr* 2005, **4**: 27-36.
11. Courtin F, Dupont S, Zeze DG, Jamonneau V, Sané B, Coulibaly B, Cuny G, Solano P: **Trypanosome Humaine Africaine: transmission urbaine dans le foyer de Bonon (Côte d'Ivoire).** *Trop Med Int Health* 2005, **4**: 340-346.
12. Rogers DJ, Randolph SE: **Mortality rates and population density of tsetse flies correlated with satellite imagery.** *Nature* 1991, **351**: 739-741.
13. Kitron U, Otieno LH, Hungford LL, Odulaja A, Brigham WU, Okello OO, Joselyn M, MohamedAhmed MM, Cook E: **Spatial analysis of the distribution of tsetse flies in the Lambwe Valley, Kenya, using Landsat TM imagery and GIS.** *J Anim Ecol* 1996, **65**: 371-380.
14. Laveissière C, Couret D, Hervouët JP: **Localisation et fréquence du contact homme/glossine en secteur forestier de Côte d'Ivoire, Recherche des points épidémiologiquement dangereux dans l'environnement végétal.** *Cah ORSTOM, Sér Ent Méd Parasitol* 1986, **24**: 21-35.
15. Simarro PP, Mas J, Lancien J, Ona Sima F, Mateo MJ, Roche J: **Epidemiology of human tripanosomiasis in the Luba focus, in Equatorial Guinea.** *Rev Sanid Hig Publica* 1990, **64**:517-534.
16. World Health Organization: **Epidemiology and Control of Human African Trypanosomiasis. Report of a WHO expert committee on sleeping sickness.** *World*

-
- Health Organization Technical Report Series* 1986, **739**.
17. Robinson TP: **Geographic Information Systems and the selection of priority areas for control of tsetse-transmitted trypanosomiasis in Africa.** *Parasitol Today* 1998, **14**: 457-461.
 18. Simarro PP, Franco JR, Ndongo P, Nguema E, Louis FJ, Jannin J: **The elimination of *Tripanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea.** *Trop Med Int Health* 2006, **5**:636-646.
 19. Penchenier L, Simarro P, Ndong-Asumu P : **Historique et evolution de la maladie du sommeil en Guinee Equatoriale.** *Bull liais doc OCEAC* 1996, **29**: 69-74.
 20. World Health Organization: *Weekly epidemiological record* 2006, **81**:71-79.
 21. Kuzoe FAS, Schofield CJ: Strategic review of traps and targets for tsetse and African Trypanosomiasis control. *Report of Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR)* 2004, TDR/IDE/TRY/05.1.
 22. Nash TAM, Page WA: **On the ecology of *Glossina palpalis* in northern Nigeria.** *Trans R Entomol Soc Lond* 1953, **104**: 71–170.
 23. Nash TAM: **Climate: the vital factor in the ecology of *Glossina*.** *Bull Entomol Res* 1937, **28**: 75–131.
 24. Laveissière C, Grebaut P, Herder S, Penchenier L: *Les glossines vectrices de la trypanosomiase humaine africaine* IRD/OCEAC, Yaoundé ; 2000.
 25. Morris KRS: **The ecology of location of epidemic sleeping sickness. I. Significance of location.** *Bull Entomol Res* 1951, **42**: 427.
 26. Nansen C, Campbell JF, Phillips TW, Mullen MA: **The impact of spatial structure on the accuracy of contour maps of small data sets.** *J Econ Entomol* 2003, **96**: 1617-1625.
 27. Gouteux JP, Lancien J: **The piramidal trap for collecting and controlling tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Comparative trials and description of new collecting technics.** *Trop Med Parasitol* 1986, **37**: 61-66.
 28. Abel PM, Kiala G, Lôa V, Behrend M, Musolf J, Fleischmann H, Théophile J, Krishna S, Stich A: **Retaking sleeping sickness control in Angola.** *Trop Med Int Health* 2004, **1**:141-148.

29. Brunhes J, Cuisance D, Geoffroy B, Hervy JP, Lebbe J : *Les glossines ou mouches tsé-tsé. Logiciel d'identification. Glossine Expert*. Manuel illustré d'utilisation, Cirard, Université Paris – VI, ORSTOM, Paris 1998.
30. Cressie N: *Statistics for spatial data*. Wiley: New Cork Press; 1991.

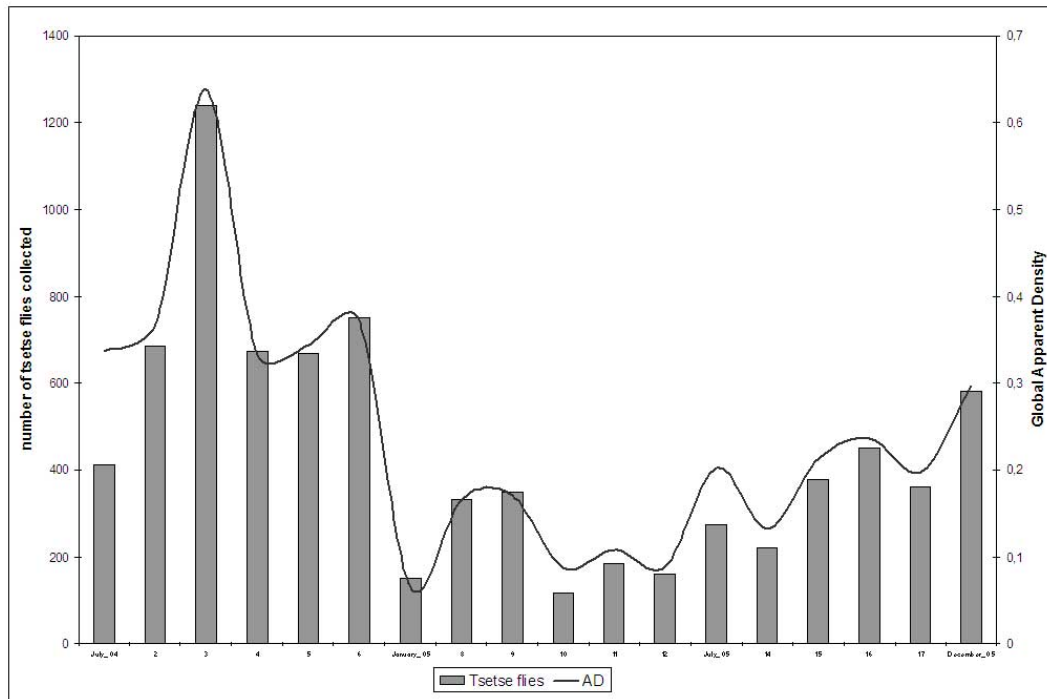


Figure 1. Evolution of the total catches and the apparent density (AD) in the Mbini focus (2004-2005)

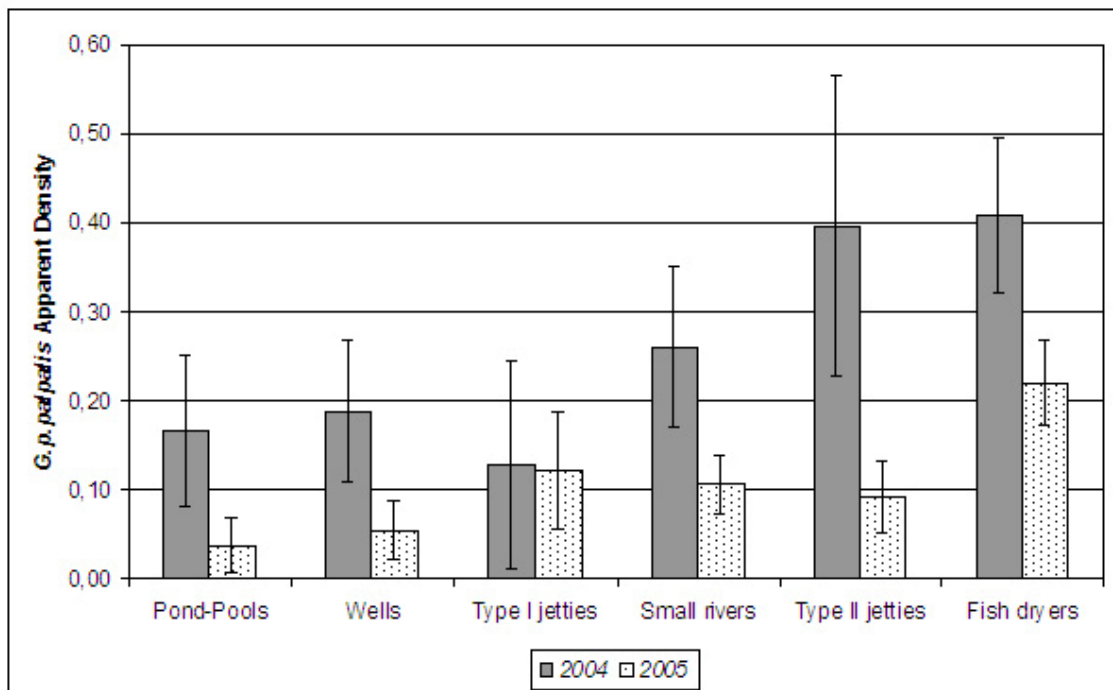


Figure 2. Annual mean apparent density for *Glossina p. palpalis* according to the location (habitat)

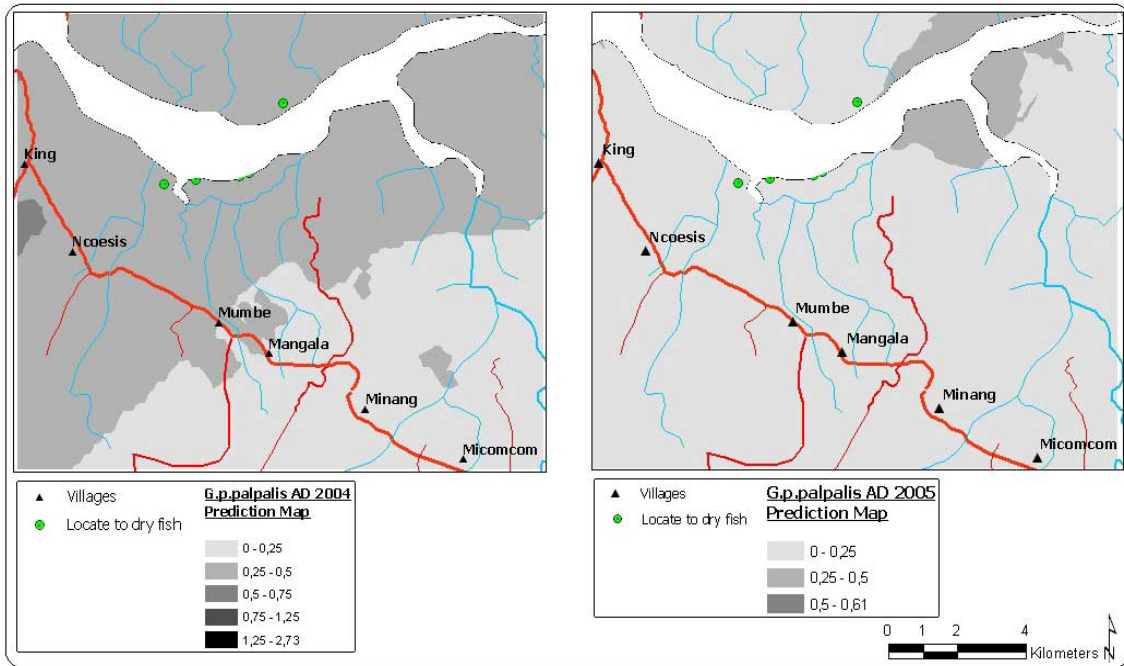


Figure 3. Prediction maps of the *G. p. palpalis* apparent density for 2004 and 2005

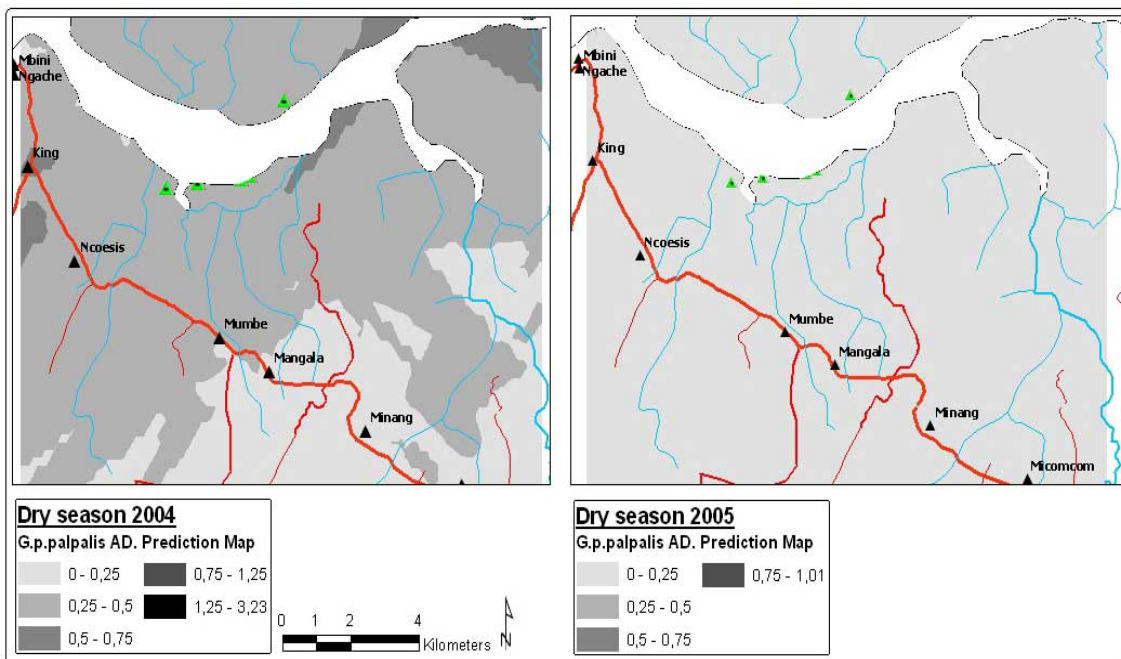


Figure 4. Prediction maps of the *G. p. palpalis* apparent density in dry season for 2004 and 2005

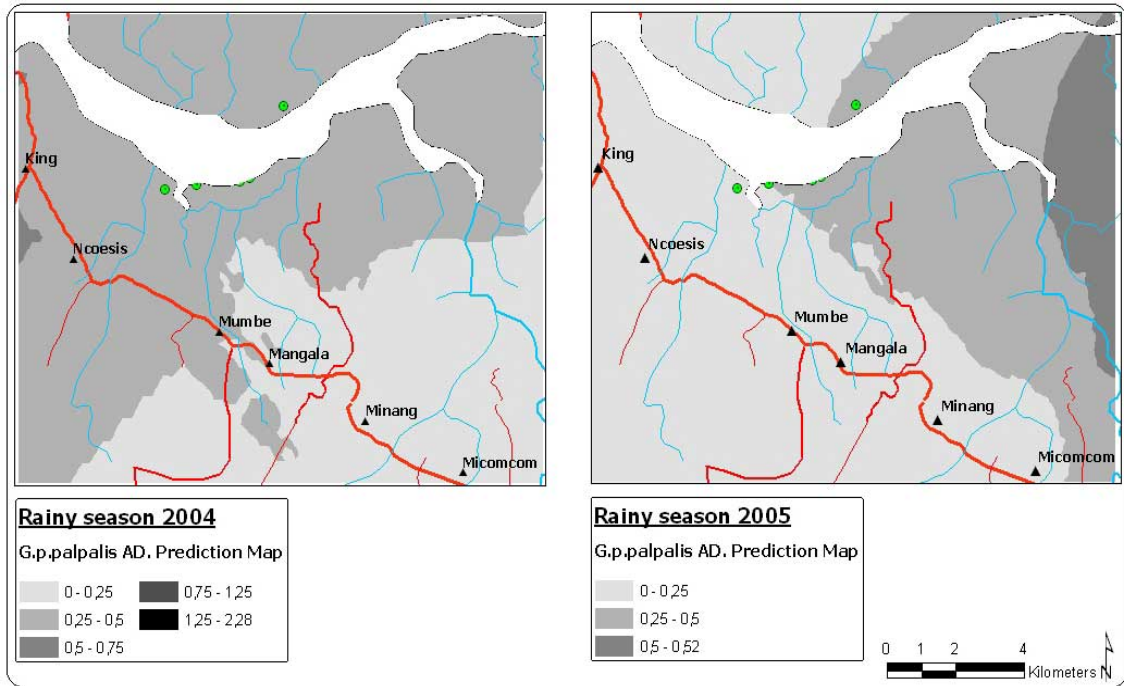


Figure 5. Prediction maps of the *G. p. palpalis* apparent density in rainy season for 2004 and 2005

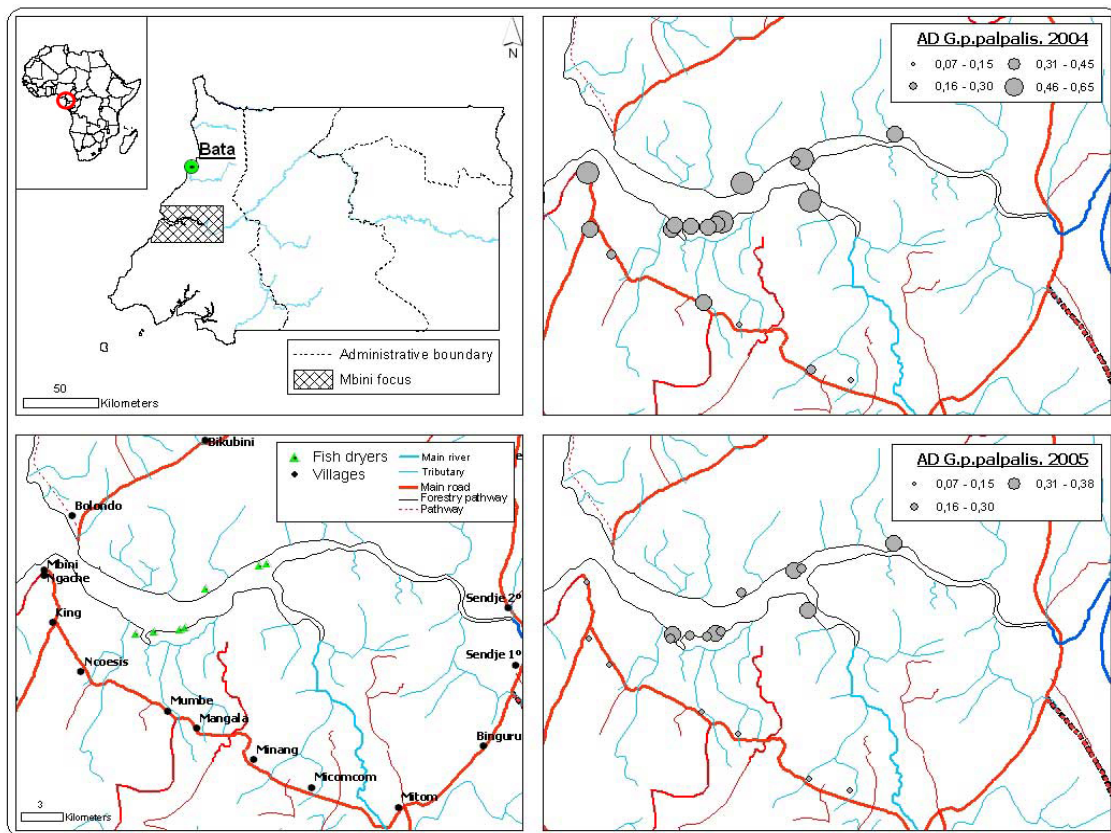


Figure 6. Distribution of pyramidal traps in the Mbini focus and mean apparent density for *G. p. palpalis* in each treatment zone (2004-2005)

Table 1. Mean apparent density for the tsetse fly species caught in the Mbini focus

	<i>Glossina p. palpalis</i>		<i>Glossina tabaniformis</i>		<i>Glossina caliginea</i>	
	Mean	±sd [#]	Mean	±sd	Mean	±sd
2004 Dry season	0,39	0,39	0,07	0,09	0,01	0,03
Rainy season	0,31	0,26	0,19	0,26	0,02	0,03
Annual	0,35	0,33	0,13	0,20	0,01	0,03
2005 Dry season	0,17	0,24	0,02	0,04	0,01	0,02
Rainy season	0,21	0,26	0,01	0,04	0,01	0,02
Annual	0,19	0,25	0,01	0,04	0,01	0,02

[#]sd –standard deviation

Table 2. Total catches and seasonal MAD of *G. p. palpalis* according to the location and season.

	2004						2005					
	dry season			rainy season			dry season			rainy season		
	N	MAD [#]	±sd ^{&}	N	MAD	±sd	N	MAD	±sd	N	MAD	±sd
Pond-Pools	87	0.18	0.24	86	0.15	0.29	5	0.00	0.02	68	0.07	0.18
Wells	65	0.10	0.14	221	0.27	0.39	67	0.05	0.18	97	0.06	0.17
Type I jetties	14	0.07	0.14	56	0.17	0.32	62	0.15	0.20	47	0.10	0.16
Small rivers	584	0.28	0.70	580	0.24	0.48	*598	0.13	0.37	*369	0.08	0.19
Type II jetties	234	0.42	0.69	274	0.37	0.54	108	0.08	0.21	129	0.10	0.17
Fish dryers	479	0.48	0.45	360	0.34	0.30	417	0.22	0.30	463	0.22	0.28
Total	1463			1577			1257			1173		

[#]MAD-Mean Apparent Density; [&]sd –standard deviation *p< 0.05

Table 3. Statistic parameters and adjustment quality of the prediction models generated using annual and seasonal AD

		2004			2005		
		dry season	rainy season	global	dry season	rainy season	global
Data	Mean	0.390	0.311	0.351	0.166	0.212	0.190
	SD^{&}	0.385	0.260	0.330	0.241	0.257	0.250
Kriging model		Ordinary	Ordinary	Ordinary	Ordinary	Universal	Ordinary
Transform data		No	No	No	No	No	No
Trend Removal		No	No	No	No	Yes	No
Searching Neighborhood	Radius (m)	9924.7	9509.9	9509.9	9924.7	9509.9	9924.7
	Angle	0	0	0	0	0	0
Prediction error measurements	Mean	0.021	0.005	0.012	0.005	0	-0.0004
	MSE[#]	0.435	0.302	0.338	0.157	0.113	0.102
	Average Stand. Error	0.4	0.282	0.308	0.144	0.11	0.102
	SMSE^{\$}	1.09	1.074	1.098	1.088	1.015	1.006

[&]sd –standard deviation; [#]MSE-Mean Square Error; ^{\$} SMSE- standardised mean square error;

2. Predicción de la distribución y dispersión de *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Glossinidae) en la estación lluviosa y seca en el foco de tripanosomiasis de Kogo (Guinea Ecuatorial)

Resumen

La Tripanosomiasis Humana Africana es una enfermedad parasitaria transmitida por un vector hematófago. Los parásitos son transmitidos al hombre por la mosca tsetse (Diptera: Glossinidae). El empleo de medidas para reducir el contacto hombre-vector es fundamental para asegurar un control rápido en las áreas de alta transmisión.

Este estudio se llevó a cabo para predecir la distribución y dispersión de las poblaciones de *Glossina palpalis palpalis* en estación seca y lluviosa, y para analizar el impacto del empleo de trampas piramidales ([Gouteux y Lancien, 1986a](#)) sobre las poblaciones de mosca tsetse del foco endémico de tripanosomiasis de Kogo (Guinea Ecuatorial) en los años 2004 y 2005.

Hay tres especies de mosca tsetse presentes en el foco de Kogo: *Glossina palpalis palpalis*, principal vector de la enfermedad del sueño en África del Oeste y Central, *Glossina caliginea* y *Glossina tabaniformis*. La densidad aparente de *G. p. palpalis* experimentó un descenso brusco, de 1,23 moscas tsetse/trampa/día en julio de 2004 a 0,27 en diciembre de 2005. Se observó una reducción significativa en el promedio de la densidad aparente entre estaciones climáticas y años. La diversidad ecológica fue relativamente baja en todos los puntos de muestreo, *G. p. palpalis* predominó claramente sobre el resto de especies, y disminuyó significativamente como consecuencia de las actividades de control. Los modelos predictivos generados a partir de las mediciones puntuales de la densidad aparente, mostraron diferencias notables entre estaciones climáticas tanto en la densidad como distribución de las poblaciones de *G. p. palpalis*.

En el foco de Kogo, las trampas piramidales han mostrado ser un instrumento eficaz para reducir la densidad de las poblaciones de mosca tsetse. Teniendo en cuenta la extensión del foco, desde el sur de Guinea Ecuatorial hasta el norte de Gabón, las intervenciones deben llevarse a cabo a una escala mayor, implicando a los dos países, para garantizar el éxito del control a medio-largo plazo.

Predicted distribution and movement of *Glossina palpalis palpalis* (Diptera: Glossinidae) in the wet and dry seasons in the Kogo trypanosomiasis focus (Equatorial Guinea)

Jorge Cano^{1§}, Miguel Ángel Descalzo¹, Nicolás Ndong-Mabale^{2,3}, Pedro Ndong-Asumu³, Leonardo Bobuakasi², Sisinio Nzambo-Ondo², Agustín Benito¹ and Jesús Roche¹

¹National Centre for Tropical Medicine and International Health, Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 6, 28029, Madrid, Spain.

²Reference Centre for Endemic Control, Instituto de Salud Carlos III, Bata, Equatorial Guinea.

³National Sleeping Sickness Control Programme (NSSCP), Ministry of Health and Social Welfare, Bata, Equatorial Guinea.

[§]Corresponding author´s:

Jorge Cano Ortega – jcano@isciii.es, National Centre for Tropical Medicine and International Health, Instituto de Salud Carlos III, Sinesio Delgado 6, 28029, Madrid, Spain.

Keyword index: tsetse fly control, mono-pyramidal trap, Equatorial Guinea (Central Africa), spatial analysis, kriging

ABSTRACT

Human African Trypanosomiasis (HAT) is a vector-borne parasitic disease. The parasites are transmitted to humans by the tsetse fly (Diptera: Glossinidae). The use of measures to reduce the human-vector contact is fundamental to ensuring rapid control in the high transmission areas. This study aims to predict distribution and movement of *Glossina palpalis palpalis* populations in the wet and dry seasons and to analyze the impact of the use of mono-pyramidal traps (Gouteux and Lancien 1986) on the tsetse fly populations, in the Kogo focus in 2004 and 2005. Three glossina species are present in Kogo: *Glossina palpalis palpalis*, major HAT vector in West-Central Africa, *Glossina caliginea* and *Glossina tabaniformis*. *G. p. palpalis* apparent density (AD) clearly fell from 1.23 tsetse flies/trap/day in July 2004 to 0.27 in December 2005. A significant reduction in the mean AD for this species was noted between seasons and years. The diversity of glossina species was relatively low at all the sampling points, *G. p. palpalis* clearly predominated over the other species, and significantly dropped as consequence of control activities. The predictive models generated for the seasonal AD showed notable differences not only in the density but in the distribution of the *G. p. palpalis* population between the rainy and dry season. The mono-pyramidal traps have proven to be an effective instrument for reducing the density of the tsetse fly populations, although given that the Kogo trypanosomiasis focus extends from the southern Equatorial Guinea to northern Gabon, interventions need to be planned on a larger scale, involving both countries, to guarantee the success of the control in the medium-long term.

INTRODUCTION

Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness, is a vector-borne parasitic disease. The parasites are transmitted to humans by the tsetse fly (Diptera: Glossinidae), which is found in Sub-Saharan Africa. Sleeping sickness is considered a re-emerging disease and is included in the group of neglected diseases (Cattand et al. 2001). At the end of the 90s, and up to 2001, 60 million people were estimated to be living in high risk infection areas and that between 300,000 to 500,000 people were infected (WHO 2001). However, the epidemiological situation has improved notably over the last 4 years thanks to increase of surveillance activities. Therefore, it is currently estimated that the number of new cases per year has fallen to 17,500 and that the accumulative rate stands between 50,000 and 70,000 cases (WHO 2006).

Vertical programs are usually used for HAT control (WHO 1998, Stich 2002, Abel et al. 2004) and are based on combining measures, such as the active cases detection and treatment, and vector control. During the 80s, the HAT epidemic in Uganda was brought under control by combining diagnosing and treating cases with the use of impregnated traps and non-residual insecticide fumigation (Lancien 1991, Allsop 2001).

The active cases detection is periodically conducted using field teams. In the diagnostics, serological tests (CATT) are used for an initial screening (Magnus et al. 1978) and a parasitological search for subsequent diagnosis confirmation (Abel et al. 2004, Simarro et al. 2006).

Therefore, although the basis for controlling sleeping sickness is reservoir sterilization, the use of simple and practical measures to reduce the human-vector contact is fundamental to ensuring rapid control in the high transmission areas (Rickman R, 2002, Abet et al, 2004).

During the 80s, traps were frequently used to control and study vector populations in endemic countries in Central and Western Africa (Gouteux and Lancien 1986A, Gouteux and Lancien 1986B, Simarro et al. 1990, Laveissière et al. 1990). Studies conducted in Congo, Cameroon and Ivory Coast foci, where the main vector is *Glossina palpalis palpalis*, have shown traps to be highly effective in controlling transmission, as they reduce the density and survival of the vector populations (Eouzan et al. 1978, Lancien 1981, Laveissière et al. 1981).

A campaign, known as the "*Pan African Tsetse and Trypanosomiasis Eradication*

Campaigr' (PATTEC), was recently launched by the Organization of African Unity (OAU) whose main objective is eradicate the tsetse fly in Africa by means of introducing males sterilized through exposure to gamma radiation into the vector populations. This initiative is based on the success obtained in eradicating the *Glossina austeni* populations on the Island of Zanzibar (Vreysen et al. 2000).

In Equatorial Guinea, the first vector control experience was conducted in 1985, on the Luba insular focus. During the three months of activity, 6,080 tsetse flies were collected using 85 mono-pyramidal traps. The apparent density (AD) fell from 4 tsetse/trap/day to 0.4. The mean age of the *G. p. palpalis* population decreased to 15 days after the three months of activity (Simarro et al. 1990).

In 2002, a vector control program was implemented based on the use of mono-pyramidal traps in the Kogo and Mbini continental foci. A total of 28,573 tsetse flies were caught over 9 months of activity. The global AD in the foci dropped from 2.87 tsetse/trap/day to 0.57 (unpublished data, NSSCP). In 2003, the mono-pyramidal traps were replaced by deltamethrine-impregnated screens and a notable recovery of the tsetse fly populations was noted after one year (unpublished data, NSSCP). In 2004, control activities using mono-pyramidal traps were reintroduced.

This study aims to predict distribution and movement of *G. p. palpalis* populations in the wet and dry seasons and to analyze the impact of the use of mono-pyramidal traps on the tsetse fly populations, in the Kogo focus in 2004 and 2005.

MATERIAL AND METHODS

Study area

The Kogo district is in the south of the continental region of Equatorial Guinea and borders on Gabon. There are 9,535 individuals, 4,644 men and 4,891 women, censored in the Kogo district. Eight hundred and twelve live in the urban area (Kogo city) and 8,723 in the rural area. The mainstay of the population of the Kogo district is artisanal fishing in the Muni estuary (confluence of three major rivers). The population has set up different points along the waterways where they temporarily reside to dry the fish (**figure 1**).

The mangrove (*Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida*) is found along the coastal river mouths of the mainland region, but is particularly abundant at the confluence of the three rivers that make up the Muni estuary. This ecosystem is an ideal habitat for the

main HAT vector in Central and Western Africa, *G. p. palpalis* (Laveissière et al. 2000).

Equatorial Guinea mainland has a typically equatorial climate. Two dry seasons (December-March, June-September) and two rainy seasons (March-June, September-December) alternate. The annual rainfall amounts to 2074 mm over 118 rainy days. The annual relative humidity ranges between 70% and 100%. The average temperature is 25 °C, with a minimum of 17°C and a maximum of 30°C.

Tsetse flies collection and processing

The mono-pyramidal trap (Gouteux and Lancien 1986A), supplied by Veestergaard-Frandsen®, was used to catch and control glossinas in the Kogo focus. It includes a system to collect and conserve the tsetse flies and it can therefore be used to determine entomological parameters.

In June 2004, 75 mono-pyramidal traps were placed at the locations considered to have the highest transmission risk: jetties and fish dryers along the Mitong and Congüe rivers (**figure 1**). These zones were established taking into account the distribution of tripanosomiasis cases over the last 5 years. The location of the traps was recorded using a GPS receiver. Taking into account that the study area has a total surface of 926.98 km², the density of traps was 0.08 traps/km².

The traps were checked every two weeks during the two first months of activity and monthly after the third. In the field, the tsetse flies were counted and preserved in absolute ethanol. Subsequently, Brunhes J et al (1998) key was used to determine the species in the reference laboratory (Brunhes et al. 1998), sex and an age estimator based on the degree of wear or fraying observed on the hind margin of the wing (Laveissière et al. 2000).

Entomological indicators and statistical analysis

The apparent density per trap (AD), number of flies caught per trap and day, for each treatment or control zone, were established as the base and monitoring indicators in order to determine the effectiveness of the pyramidal traps in controlling the tsetse fly populations. These zones were established taking the area of influence of the traps into account.

The impact of the use of the mono-pyramidal traps on the diversity of tsetse fly populations in the focus and the relative abundance of the different species (evenness) were also assessed. The inverse of Simpson's Diversity Index was used to determine population diversities and their variation in time. This index is commonly used in

ecology to quantify the biodiversity of a habitat.

$$\text{Simpson's Diversity Index (SDI)} = 1/D = 1/\sum (n/N)^2,$$

where n is the total number of individuals of a species collected in a sample and N the total number of sampled individuals.

This diversity index takes into account the number of species present and the relative abundance of each one (Krebs 1989).

On the other hand, it is of interest to determine the evenness or uniformity of the sampling. This is established using the Simpson Diversity Index and the maximum diversity value.

$$E = D/D_{\max} = 1/\sum (n/N)^2 * 1/S$$

A modified version of the Jackson classification (1946), where only 4 categories or degradation levels of the back edge of the wing were established (Simarro et al. 2000), was used to analyze the impact of the mono-pyramid traps on the age of glossina populations.

Using non-parametric tests (Mann-Whitney test, Kruskal-Wallis test), the annual and seasonal variability of the AD for each species and the impact of the control strategy on the diversity of tsetse fly populations were studied. In all cases, values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant.

Spatial analysis and validation of the prediction models

Kriging is a geostatistical spatial interpolation method that is used to generate prediction surfaces by using point data from sampled stations (Cressie 1991). The *ordinary kriging* and the *universal kriging* were used to estimate the annual and seasonal AD of *G. p. palpalis* throughout the epicenter of the Kogo focus for 2004 and 2005 using the sampling carried out with the traps. The possible trends in the spatial distribution of the data were analyzed and the directionality (anisotropy) in the spatial autocorrelation of the collected AD values was studied. They were then included in the model when it was considered that they improved the prediction. The analysis was conducted using the Geostatistical Analyst extension included in the ArcGIS 9.1 software.

In order to determine the reliability of the estimates provided by the prediction surface areas, a crossed validation method was used. This method consists in carrying out as many interpolations and measurements as in the model. In each process, the

measurement value of one of the traps was produced and using a linear regression analysis, the correlation that exists between the mean value (observed) was compared to the prediction generated for that point with the rest.

As a result of this crossed validation, a series of parameters was obtained that determined the quality of the prediction: the mean and the mean standard prediction error, the mean square error (MSE) and the standardised mean square error (SMSE). In order for a model to be considered as providing a good prediction, the mean prediction error must be near to 0, the MSE and mean standard prediction error as small as possible, and the SMSE near to 1.

RESULTS

Between July 2004 and December 2005, a total of 20,224 glossinae was caught; 18,992 (93.9%) *Glossina palpalis palpalis*, 673 (3.3%) *Glossina tabaniformis* and 559 (2.8%) *Glossina caliginea*. During that period, a monthly average of 69 traps was operative, while the remainder had broken or had fallen at the time of being checked.

The global AD clearly fell (Mann-Whitney test $p < 0.05$) over time, and went from 1.23 tsetse flies/trap/day in July 2004 to 0.27 in December 2005, although an increase in the catch number was noted in some months (November 2004 and July 2005) (figure 2).

Table 1 sets out the mean AD data for the three species by season and year. In 2004, the mean apparent density (MAD) of *G. p. palpalis* in the Kogo focus was 1.03 (sd: 0.59) in the dry and 0.81 (sd: 0.55) in the rainy season. The following year, the MAD fell to 0.60 (sd: 0.72) in the dry and 0.36 (sd: 0.36) in the rainy season. A significant reduction in the MAD for this species was noted between 2004 and 2005. It fell from 0.88 (sd: 0.57) to 0.46 (sd: 0.55). Significant differences were noted between the 4 periods (year-season) (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

In the case of the other two species of tsetse fly (table 1) the MAD values were very low during the two-year study period and significant differences were noted by years and seasons. When these differences were analysed in detail, a significant drop in the annual MAD was noted for *G. tabaniformis*, but not between seasons for the second year of activity. In the case of *G. caliginea* no significant seasonal or annual differences being detected.

The diversity of glossina species was relatively low at all the sampling points and the

G. p. palpalis clearly predominated over the other species. In 2004, the mean SDI value was 1.18 (sd: 0.27), which significantly fell to 1.05 (sd: 0.16) in 2005. The greatest diversity (SDI: 2.05 and 2.38, in 2004 and 2005 respectively) was founded in the zone where the tsetse fly apparent density was highest, the epicenter of the focus. This zone coincides with the stretch of the river where there is the greatest concentration of fish dryers (greatest human activity) (figures 3 and 4). The evenness index in 2004 was 0.39 (sd: 0.09), which fell to 0.35 (sd: 0.05) in 2005.

A greater number of *G. p. palpalis* females than males (55.3% females and 44.7% males) were collected. The female/male ratio was greater than 1 most of the time with two marked peaks being noted during the months following those when there was a higher number of catches (figure 5).

Figure 6 shows the proportion of *G. p. palpalis* adults that belong to group 1 (G1), according to Jackson (1946) age classification, for each catch month. At the start of the study, 90.2% of the males and 89.4% of the females collected were young individuals (G1), which reached 100% in month four of the study. In December 2004, a drop in the number of G1 caught was noted, even though they again were the majority two months later. Another drop in the G1 percentage for both sexes was noted in the last months of the study.

Table 2 sets out the quality of the best simulations performed of the prediction surfaces of the annual and seasonal AD for *G. p. palpalis* and the main descriptive parameters of each model.

In the 2004 prediction model, a zone can be noted where the *G. p. palpalis* density is higher (over 1 tsetse fly/trap/day), which coincides with the estuary stretch where there is the greatest concentration of fish dryers, the area of influence of three villages (Ondeng, Vabe and Fula). In 2005, the *G. p. palpalis* population dropped notably throughout the zone (figure 3).

If we analyze the models generated for the seasonal AD, notable differences can be seen not only in the density but in the distribution of the *G. p. palpalis* population between the rainy and dry season. During the dry season, there is a higher concentration of this species in the epicenter of the focus, the area of influence of the Ondeng, Fula, Vabe, Miguala and Mibonde-Etofilo villages. However, during the rainy season, the vector would disperse following the tributaries, with a more homogeneous distribution throughout the study area (figure 4).

The differences between the 2004 and 2005 AD prediction surfaces provide us with an estimate of the impact of the mono-pyramidal traps on the human-vector contact. Thus, for the whole interpolation area, from one year to another, the *G. p. palpalis* AD fell by an average of 0.46 (sd: 0.18).

DISCUSSION

The mono-pyramidal traps have proven to be an effective instrument for reducing the density of the tsetse fly populations in the Kogo trypanosomiasis focus (Equatorial Guinea). The results of this study would be in line with what have been observed in other regions of Equatorial Guinea (Simarro et al. 2000) and in neighboring countries (Gouteux and Lancien 1986B; Abel et al. 2004).

The vector control activities are aimed at reducing the human-vector contact. In the case of trypanosomiasis, this control was conducted by progressively decreasing the tsetse fly populations, either by physical (use of traps, altering the ecosystem of the vector), chemical (extensive fumigation, trap sprinkling) and/or genetic methods (sterilizing populations by introducing irradiated males) (Kuzoe et al. 2004).

The success of the vector control campaigns is based in the low reproduction rate of the glossinas (Leak 1998). Therefore, the eradication of adult specimens results, over time, in a progressive reduction of the glossina population, and therefore, in a drop in the human-vector contact (Rogers et al. 1985). As can be seen in figure 7, a notable reduction in the number of trypanosomiasis cases in the Kogo focus was noted following the implementation of the vector control activities in 2002 (unpublished data, NSSCP). Up to that year, controlling the disease was based in the active search of cases in accordance with the protocol established by the WHO (WHO 1986).

Estimating the absolute size of the tsetse fly populations raises many difficulties. However, population dynamic models and estimates were needed to be able to assess, in the final instance, the real effectiveness of the implemented vector control strategies. According to some authors, the best way to determine the size of a population is by means of capture-mark-recapture sampling (Jackson 1953; Hargrove et al. 1994). In addition to determining the density of a population, this type of study also allows the dispersion capacity to be assessed. Other authors have opted to use traps to extrapolate population size (Zippin 1956, Ryan et al. 1981, Gouteux and Lancien 1986A, 1986B). In this case, the following hypotheses are used as the starting point: that the population is

isolated and that the capture means a progressive decrease in the number of individuals subsequent captured. This means assuming that the population is stationary, that the inclusion probability during a specific period is the same for all traps, and that probability is, also, constant. In this study, it was decided to use the mono-pyramidal trap due to its proven effectiveness in controlling *G. p. palpalis* and, as it includes a collection instrument, it allows the relative impact of the strategy on the human-vector contact to be assessed.

A challenge of this control campaign was to use them non extensively, or else as a protection instrument in the previously identified zones as the greatest risk of transmission. These zones were demarcated taking into account: the distribution of the cases over the last 5 year, in which sector the patients worked (fishing, hunting, farming) and the places frequented. This way of using traps is unusual for controlling trypanosomiasis vectors. In fact, it is considered that the trap density has to be determined by the local abundance of tsetse flies, as well as the dispersion capacity of the species to be found in the zone (Kuzoe et al. 2004). Nash (1953) noted that the *G. p. palpalis* populations may travel up to 3 km from their breeding grounds. In order to control the riverbank vector glossinae, as is the case of *G. palpalis*, the optimum distribution is considered to be 10 traps per linear kilometer, even though good results have been noted using 1 trap every 300 m (Laveissière et al. 1990).

The low trap density may be the reason why, despite the significant and progressive decrease of the AD for the three species, a notable increase in the *G. p. palpalis* catches was seen at two points of the study, coinciding with the end of the rainy season. Some authors have noted that, during the rainy periods, the dispersion of *G. palpalis* populations is frequent, as well as the extension and recolonization from areas with less population pressure (Nash 1937). The hypothesis of recolonization from non-treated zones is backed by the increased number of older tsetse flies (males and females) caught during these two AD peaks, which was more marked at the end of the first rainy period (figure 6). In addition, the prediction surfaces generated for the seasonal AD reveal a clear concentration of the *G. p. palpalis* populations during the dry season, while there seems to be greater homogeneity in the distribution in the rainy season, possibly as the result of this dispersion phenomenon (figure 4). However, doubts exist regarding the origin of these recolonizations. It is possible that they take place from untreated zones within the focus, as the result of the selective distribution of the traps, although it is also possible that they have taken place from the neighboring Gabon, where there are not

records that vector control activities are being carried out.

On the other hand, although the *G. p. palpalis* is the predominant species in the zone, the coexistence with another anthropophilic species (*G. caliginea*) hinders the implementation of eradication strategies, such as the use of genetically altered individuals (Molyneux, 2001). In Kogo, the use of traps has not only managed to significantly reduce the density of the main vector species, but has, also, notably reduced the tsetse fly population diversity. Therefore, after two years of activity, the presence of *G. caliginea* in the zone is practically imperceptible. This type of action facilitates, in a future, the success of the eradication activities.

In conclusion, the main technical difficulty raised by controlling the tsetse fly populations is the extension and heterogeneity of the areas that have to be treated. The geographical limits of the target population need to be correctly defined to determine the scale of the intervention. Therefore, in small-scale interventions, there is usually a rapid reinvasion from the surrounding areas when the control activities are stopped or slowed down. The problem is similar in large-scale interventions, unless the vector population is completely eradicated (Malavasi et al. 2004). Given that the Kogo focus extends from the southern Equatorial Guinea to northern Gabon, interventions need to be planned on a larger scale, involving both countries, to guarantee the success of the control in the medium-long term. These interventions should be based on intensifying the detection and treating cases throughout the area, and the use of mono-pyramidal traps, selectively in the points of lower transmission and extensively in the zones with the highest transmission risk. The implementation of other vector control strategies to reinforce the interventions with traps, such as the introduction of sterile males, requires more exhaustive studies into the dispersion capacity of the *G. p. palpalis* populations in the zone.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the National Sleeping Sickness Control Program, the Republic of Equatorial Guinea's Ministry of Health and Social Welfare, for its technical support during the study. This study was funded by the Spanish International Cooperation Agency (AECI) and the Instituto de Salud Carlos III within the Network of Tropical Diseases Research Centers (RICET-RD06/0021).

REFERENCES CITED

1. Abel, P.M., Kiala, G., Lôa, V., Behrend, M., Musolf, J., Fleischmann, H., Théophile, J., Krishna, S., and A. Stich. 2004. Retaking sleeping sickness control in Angola. *Trop. Med. Int. Health.* 1:141-148.
2. Allsop, P. 2001. Options for vector control against tripanosomiasis in Africa. *Trends Parasitol.* 17:15-19.
3. Brunhes, J., Cuisance, D., Geoffroy, B., Hervy, J.P., and J. Lebbe. 1998. Les glossines ou mouches tsé-tsé. Logiciel d'identification. *Glossine Expert. Manuel illustré d'utilisation*, Cirard, Université Paris – VI, ORSTOM, Paris.
4. Cattand, P., Jannin, J., and P. Lucas. 2001. Sleeping sickness surveillance: an essential step towards elimination. *Trop. Med. Int. Health.* 6:348-361.
5. Cressie, N. 1991. *Statistics for spatial data*. Ed. Wiley, New Cork.
6. Eouzan, J.P., and L. Ferrara. 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.
7. Gouteux, J.P., and J. Lancien. 1986A. The pyramidal trap for collecting and controlling tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Comparative trials and description of new collecting technics. *Trop. Med. Parasitol.* 37: 61-66.
8. Gouteux, J.P., and J. Lancien. 1986B. Control of vectors by trapping and its impact on sleeping sickness in a zone of high density of *Glossina fuscipes quanzensis* (Lefini River, Republic of the Congo). *Trop. Med. Parasitol.* 37:101-104.
9. Hargrove, J.W., and C.H. Borland. 1994. Pooled population parameter estimates from mark–release–recapture data. *Biometrics* 50: 1129–1141.
10. Jackson, C.N. 1953. A mixed population of *Glossina morsitans* and *G. swynnertoni*. *J. Anim. Ecol.* 2: 78–86.
11. Krebs, C.J. 1989. *Ecological Methodology*. Ed. Harper & Row Publishers, New York.
12. 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.
13. Lancien, J. 1981. Description du piège monoconique utilisé pour l'élimination des glossines en République Populaire du Congo. *Cah ORSTOM, Sér. Ent. Med.*

- Parasitol. 4:235-238.
14. Lancien, J. 1991. Lutte contre la maladie du sommeil dans le sud-est Ouganda par piégeage des Glossines. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 71:35-47.
 15. Laveissière, C., and D. Couret. 1981. Lutte contre les glossines riveraines à l'aide de pièges biconiques imprégnés d'insecticide, en zone de savane humide. Expérimentation à grande échelle. Cah ORSTOM, Sér. Ent. Med. Parasitol. 1:41-48.
 16. Laveissiere, C., and P. Grebaut. 1990. The trapping of tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Improvement of a model: the Vavoua trap. Trop. Med. Parasitol. 41:185-92.
 17. Laveissière, C., Grebaut, P., Herder, S., and L. Penchenier. 2000. Les glossines vectrices de la trypanosomiase humaine africaine IRD/OCEAC, Yaoundé.
 18. Leak, S.G. 1998. Tsetse Biology and Ecology: their role in the epidemiology and control of trypanosomosis. CABI Publishing –in association with the International Livestock Research Institute, Nairobi.
 19. Magnus, E., Vervoort, T., and N. Van Meirvenne. 1978. A Card Agglutination Test with stained trypanosomes (CATT) for serological diagnosis of *T. b. gambiense* trypanosomiasis. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 58:169-176.
 20. Malavasi, A., Sheesly, D., and C.J. Schofield. 2004. Evaluation report of Agency Tsetse Fly eradication activities. IAEA Report to the Office of Internal Oversight Services, Vienna.
 21. Molyneux, D. 2001. Sterile insect release and trypanosomiasis control: a plea for realism. Trends Parasitol. 17: 413-414.
 22. Nash, T.A.M. 1937. Climate: the vital factor in the ecology of Glossina. Bull. Entomol. Res. 28: 75–131.
 23. Nash, T.A.M., and W.A. Page. 1953. On the ecology of *Glossina palpalis* in northern Nigeria. Trans. R. Entomol. Soc. Lond. 104: 71–170.
 24. Rogers, D.J. 1985. Trypanosomiasis "risk" or "challenge": a review. Act. Trop. 42: 5-23.
 25. Ryan, L., Molyneux, D.H., Kuzoe, F.A.S., and D.A.T. Baldry. 1981. Traps to control and estimate populations of Glossina species. Tropenmed. Parasitol. 32: 145–148.
 26. Simarro, P.P., Mas, J., Lancien, J., Ona-Sima, F., Mateo, M.J., and J. Roche. 1990.

-
- Epidemiology of human tripanosomiasis in the Luba focus, in Equatorial Guinea. *Rev. Sanid. Hig. Publica* 64:517-534.
27. Simarro, P.P., Franco, J.R., Ndongo, P., Nguema, E., Louis, F.J., and J. Jannin. 2006. The elimination of *Tripanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Trop. Med. Int. Health* 5:636-646.
28. Stich, A., Abel, P.M., and S. Krishna. 2003. Waking up to sleeping sickness. *Trends Parasitol.* 19:195-197.
29. 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., and H.U. Feldmann. 2000. *Glossina austeni* (Diptera : Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J. Econ. Entomol.* 93 : 123-135.
30. World Health Organization. 1986. *Epidemiology and Control of Human African Trypanosomiasis*. Report of WHO Expert Committee on Sleeping Sickness. World Health Organization, Geneva. Technical Report Series 739.
31. World Health Organization. 1998. *Control and surveillance of African trypanosomiasis*. Report of a WHO expert committee. World Health Organization Technical Report Series, Geneva. 881:1-114.
32. World Health Organization. 2001. *African trypanosomiasis*. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases, Geneva.
33. World Health Organization. 2006. *Weekly epidemiological record* . World Health Organization, Geneva. 81:71-79.
34. Zippin, C. 1956. An evaluation of the removal method of estimating animal populations. *Biometrics* 12: 163–189.

	<i>Glossina p. palpalis</i>		<i>Glossina tabaniformis</i>		<i>Glossina caliginea</i>	
	Mean	±sd	Mean	±sd	Mean	±sd
2004 Dry season	1.03	0.59	0.04	0.08	0.07	0.17
Rainy season	0.81	0.55	0.07	0.15	0.02	0.03
Annual	0.88	0.57	0.06	0.13	0.03	0.10
2005 Dry season	0.60	0.72	0.003	0.02	0.02	0.09
Rainy season	0.36	0.36	0.003	0.02	0.01	0.02
Annual	0.46	0.55	0.003	0.02	0.01	0.06

Table 1. Mean apparent density for the tsetse fly species collected in the Kogo focus

		2004			2005		
		dry season	rainy season	global	dry season	rainy season	global
Data	Mean	1.03	0.81	0.88	0.60	0.36	0.46
	SD	0.59	0.55	0.57	0.72	0.36	0.55
Kriging model		Ordinary	Ordinary	Ordinary	Ordinary	Universal	Universal
Transform data		No	No	No	No	No	Yes
Trend Removal		No	No	No	No	Yes	Yes
Searching Neighborhood	Radius (m)	3847.6	9924.7	9732.5 5031.1	2787.8	9544.8 2258.4	1628.9
	Angle	0	0	282	0	17.1	0
Prediction error measurements	Mean	0.0006	-0.002	-0.001	0.0001	0.0001	0.002
	MSE	0.476	0.423	0.318	0.378	0.167	0.231
	Average Stand. Error	0.449	0.415	0.316	0.339	0.168	0.244
	SMSE	1.058	1.024	1.008	1.143	0.992	1.016

Table 2. Statistic parameters and adjustment quality of the prediction models generated using annual and seasonal AD

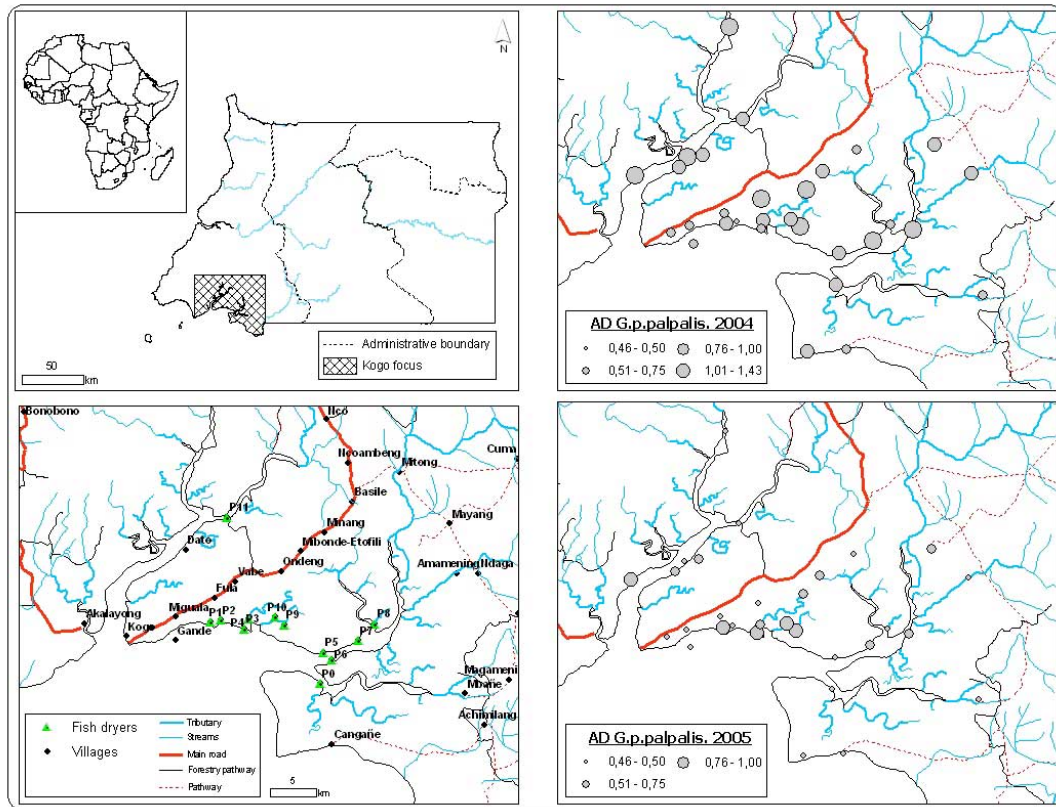


Figure 1. Distribution of pyramidal traps in the Kogo focus and mean AD for *G. p. palpalis* in each treatment zone (2004-2005)

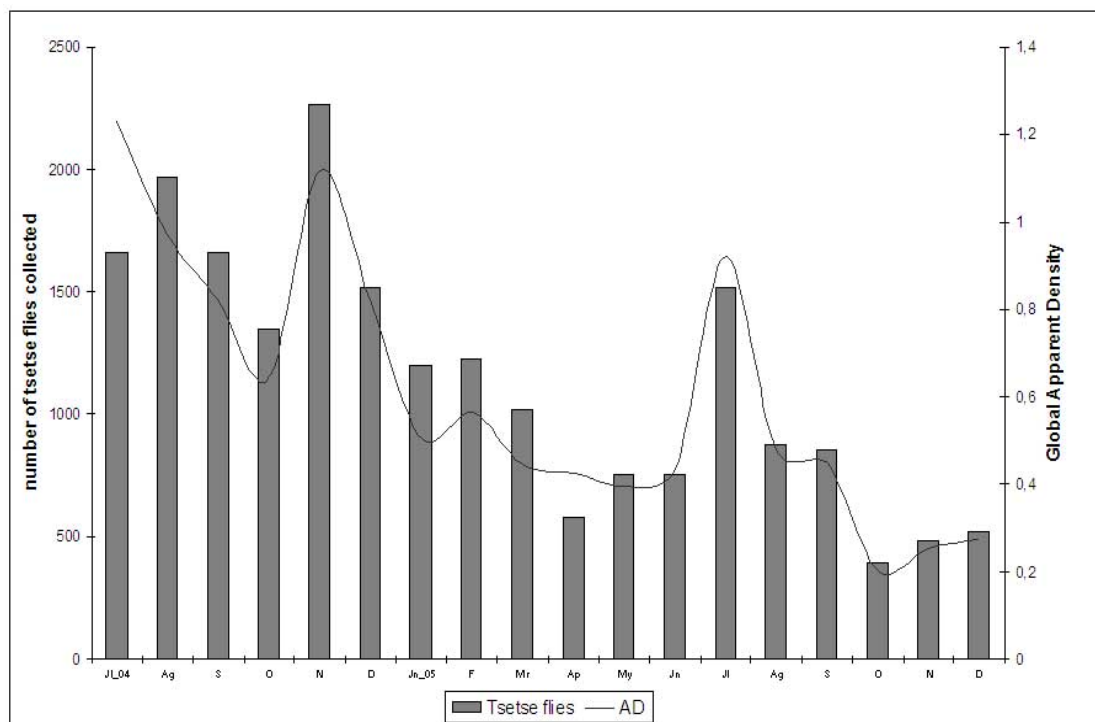


Figure 2. Evolution of the total catches and the apparent density (AD) in the Kogo focus (2004-2005)

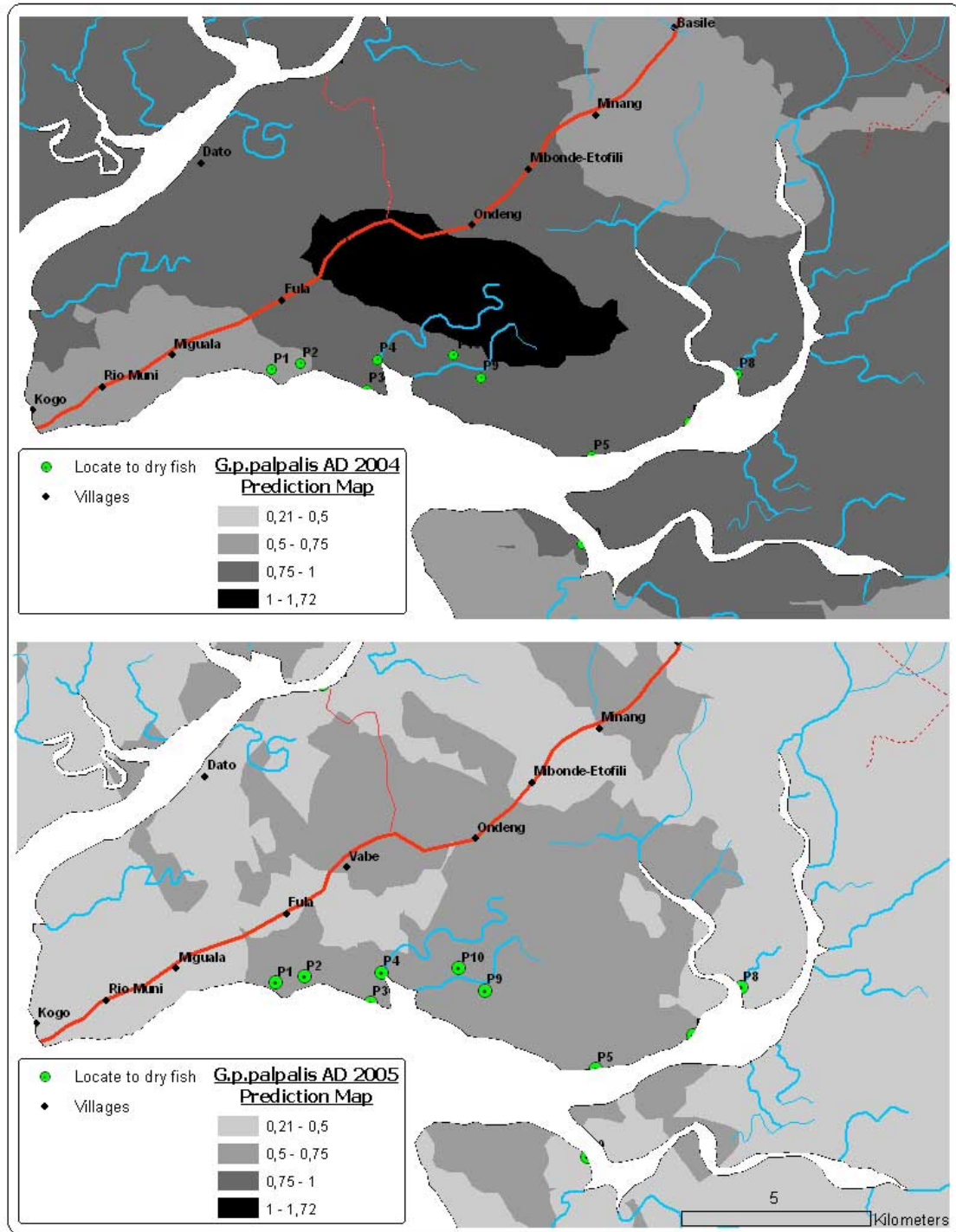


Figure 3. Prediction maps of the annual apparent density for *G. p. palpalis* for 2004 and 2005

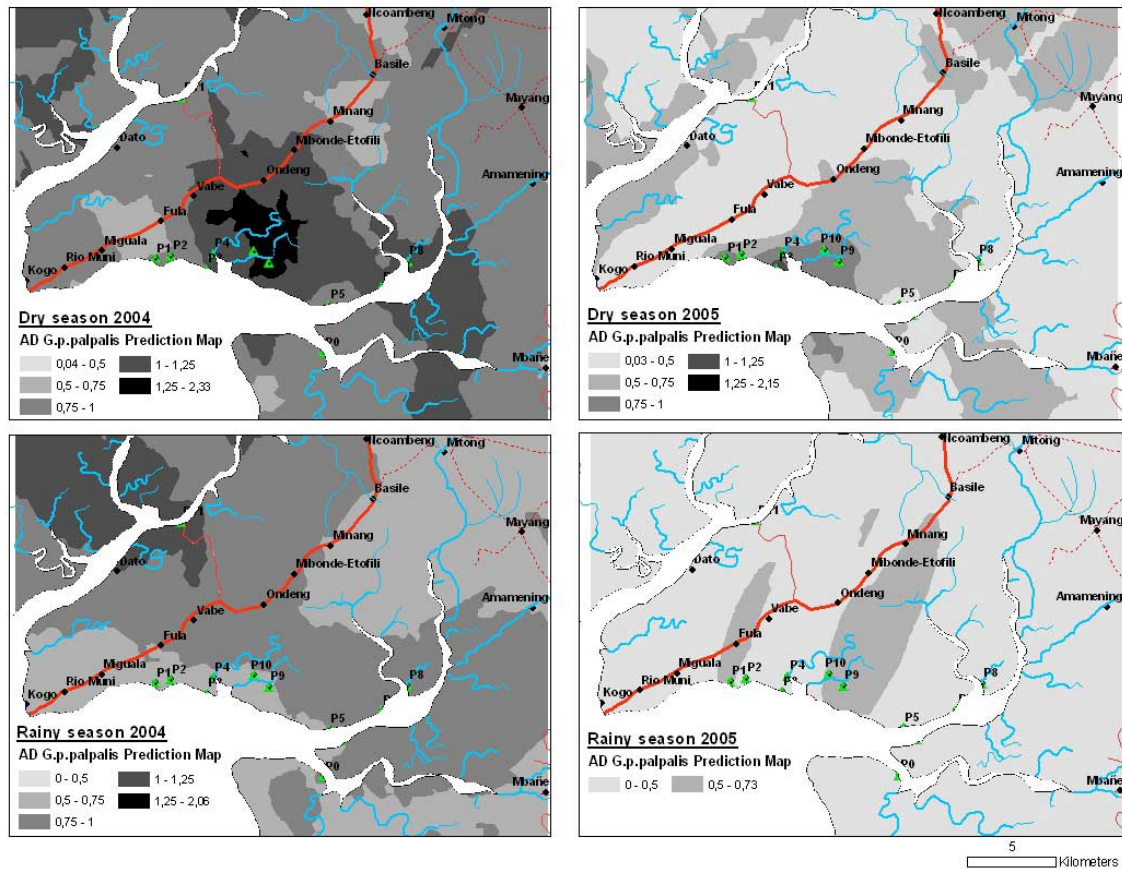


Figure 4. Prediction maps of the seasonal apparent density for *G. p. palpalis* for 2004 and 2005

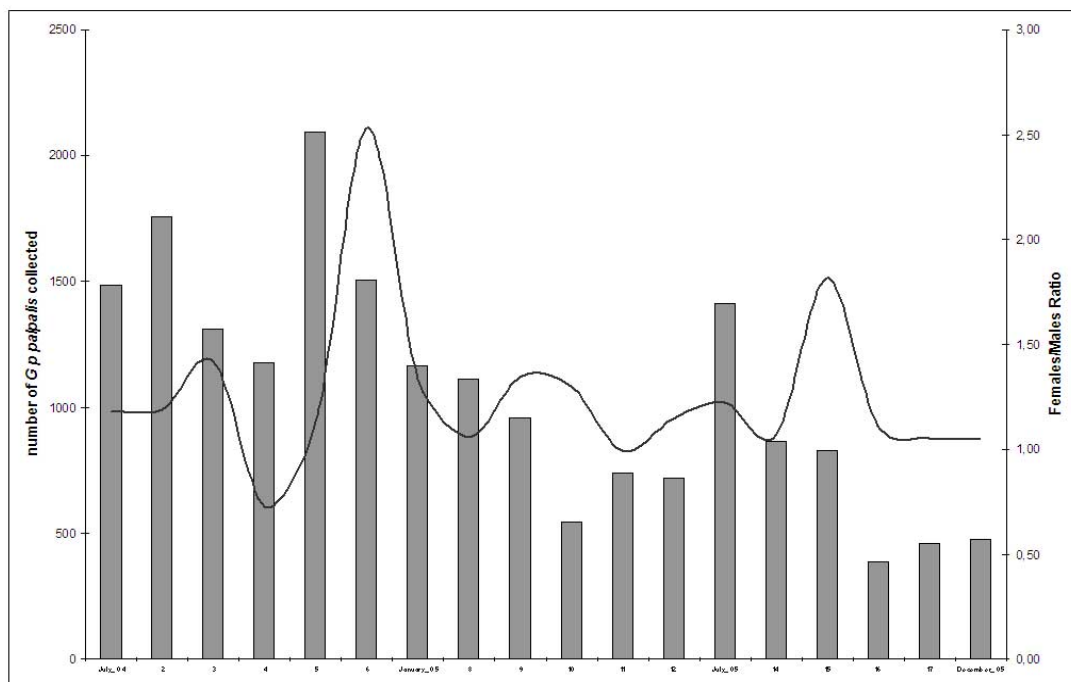


Figure 5. Evolution of the Female/Male ratio and relation with the total catches for *G. p. palpalis*.

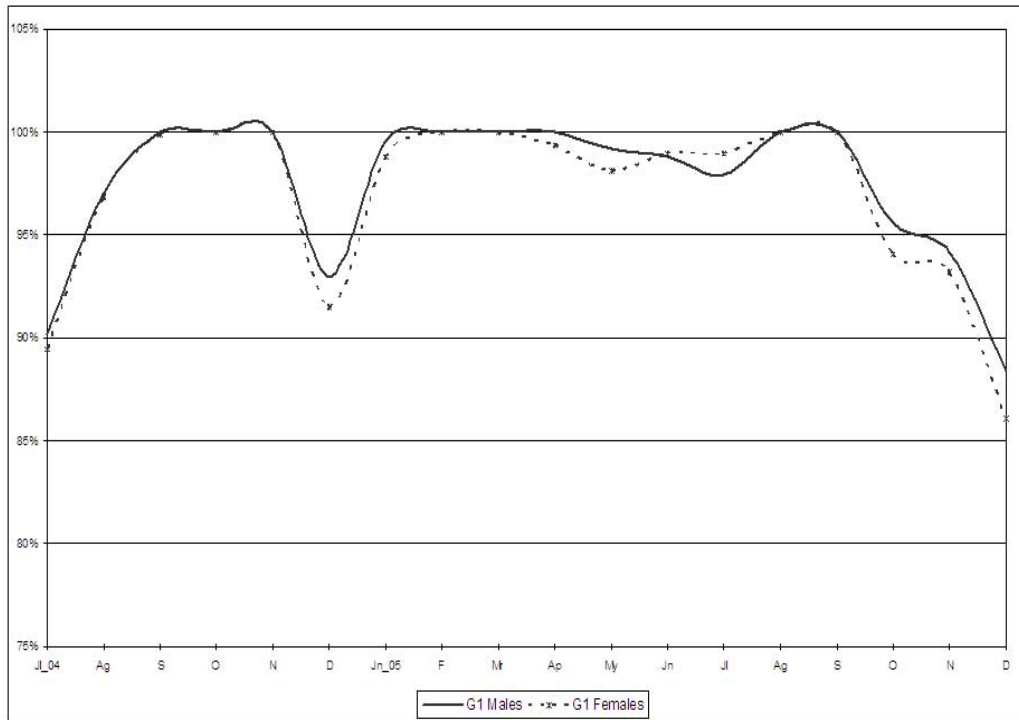


Figure 6. Monthly proportion of male and female *G. p. palpalis* belonging to Group 1 of the Jackson classification (1946).

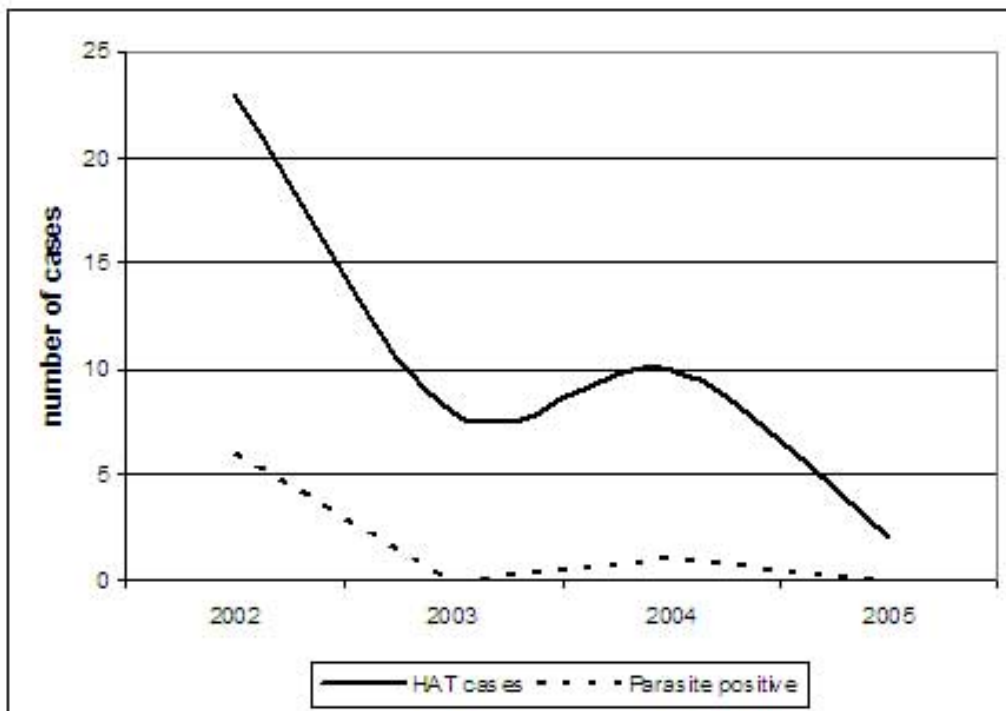


Figure 7. Evolution of the number of HAT cases in the Kogo focus (2002-2005)

3. Alta infección por *Trypanosoma* sp en ganado peridoméstico y relación con la densidad aparente de mosca tsetsé en dos focos endémicos de Guinea Ecuatorial

Resumen

En el año 2002, se llevó a cabo un estudio en los focos endémicos de tripanosomiasis de Kogo y Mbini (Guinea Ecuatorial) para determinar la frecuencia de la infección por *Trypanosoma* sp en ganado peridoméstico (cabras, ovejas y cerdos) y la relación con la abundancia de mosca tsetsé.

La detección de los tripanosomas e identificación de especie se llevó a cabo mediante PCR especie-específicas, a partir de muestras de sangre de los animales recogidas en papel Whatmann y para la captura de moscas tsetsé se emplearon trampas piramidales ([Gouteux y Lancien, 1986](#)).

El análisis molecular mostró tasas altas de infección por *Trypanosoma brucei* s.l., seguido por *Trypanosoma congolense* forest y *Trypanosoma vivax*, en los dos focos, con una frecuencia de infección global de 42,8% en Mbini y 27,1% en Kogo. Se encontró una clara asociación entre las densidades de mosca tsetsé y la infección por tripanosoma en ganado.

La infección por *Trypanosoma* sp en ganado peridoméstico es alta en los focos continentales de Guinea Ecuatorial y su distribución geográfica e intensidad están ligadas a la distribución espacial y densidad de las poblaciones de mosca tsetsé.

High *Trypanosoma* spp infection in peridomestic livestock and the relation with the apparent density of tsetse flies in two endemic foci in Equatorial Guinea

***Jorge Cano^{1,3}, Filipa Ferreira², Miguel Angel Descalzo¹, Nicolas Ndong-Mabale^{3,4}, Pedro Ndong-Asumu³, Jorge Seixas⁵, Agustin Benito¹, Jesus Roche¹, Virgilio do Rosario² and Sonia Centeno-Lima^{2,5}**

¹Centro Nacional de Medicina Tropical. Instituto de Salud Carlos III. Sinesio Delgado 6, pab 13, 28029 Madrid, Spain.

²Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. Rua da Junqueira, 96, 1349-00 Lisboa, Portugal.

³Reference Centre for Endemic Control. Instituto de Salud Carlos III. Bata, Equatorial Guinea.

⁴National Sleeping Sickness Control Programme (NSSCP). Ministry of Health and Social Welfare. Bata, Equatorial Guinea.

⁵Unidade de Clínica das Doenças Tropicais, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa. Rua da Junqueira, 96, 1349-00 Lisboa, Portugal.

E-mail: JC - jcano@isciii.es; FF – FilipaSF@ihmt.unl.pt; MAD - madescalzo@isciii.es; NN – proyectorce-malabo@guineanet.net; PN – ndongoasumu@yahoo.es; JS – JSeixas@ihmt.unl.pt; AB – abenito@isciii.es; JR – jroche@isciii.es; VR – CMDT@ihmt.unl.pt; SCL – SLima@ihmt.unl.pt.

* Corresponding author

Abstract

Background: A study was conducted in two sleeping sickness foci from Equatorial Guinea (Kogo and Mbini) in order to determine the frequency of trypanosome infection in peridomestic livestock (goats, sheep and pigs) and the relationship with the abundance of the tsetse fly.

Results: PCR assays were performed for trypanosome detection and species identification from dried blood samples on filter paper, and pyramidal traps were used to gather tsetse flies. Molecular analysis revealed high infection rate of *Trypanosoma brucei* s.l., followed by *Trypanosoma congolense* forest and *Trypanosoma vivax*, in both foci, with a global infection rate of 42.8% (Mbini) and 27.1% (Kogo). It has been found a clear association between tsetse fly densities and trypanosome infection in livestock.

Conclusiones: A *Trypanosoma* spp infection in peridomestic animals is high in the mainland foci of Equatorial Guinea and its geographical distribution and intensity is linked to the spatial distribution and density of the tsetse fly populations.

Background

Animal African Trypanosomiasis (AAT) is one of the main problems constraining the development of the sub-Saharan African countries. The tsetse fly (Diptera: Glossinidae), which transmits trypanosomiasis, is to be found over a total surface area of 10 million km², and it is estimated that 30% of African livestock are at risk of infection [1,2]. *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* and *T. vivax* cause infection in cattle, horses and small ruminants, and *T. simiae* in pigs. *T. simiae* and *T. vivax* may also be mechanically transmitted by tabanids (Diptera: Tabanidae) and other zoophagous insects.

These infections significantly affect the growth and development of the animals: livestock density can be reduced by 37-70%, milk and meat production down by 50% [3], and large areas of land are left unused, which affects agricultural and livestock production in these countries [4-6]. Numerous attempts at eradicating the vector have been performed but many of these control programmes were stopped, resulting in the untreated zones being reinvaded [7].

Furthermore, certain mammal species may play as reservoirs of human trypanosomiasis (HAT), which is clear in the case of *Trypanosoma brucei rhodesiense* [8], but more disputed in the case of the *gambiense* form [9]. Some authors consider that the fact that historical foci in Western and Central Africa are steady at a low endemic level and resurgence of epidemic outbreaks, may be due to the existence of animal reservoirs and/or asymptomatic human carriers [10,11].

Traditionally, the identification of these parasites has been based on microscopic observations, host range and geographic origin [12]. Molecular techniques are now available to detect these parasites and are effective and sensitive tools for detecting and characterising trypanosomes in the vector as well as in the mammal hosts [13-15]. However, despite the recent advances in molecular diagnosis there are still several limitations that affect sample collection and preservation, standardisation of the DNA extraction protocols, and reproducibility of the species-specific DNA amplification techniques [16,17].

The presence of the tsetse fly guarantees trypanosome infection in animals [18], but that is not so in the case of HAT that reveals a focal distribution that is normally associated with the so-called "historical foci" of the disease [19]. It has been noted that the vector populations have relatively low infection rates in the case of human

trypanosomes (<0.1%) and higher in the case of non-human trypanosomes (10-15%) [20]. Despite this variability in the potential for infection, the tsetse fly density and the infection rates are considered to be the main entomological determinants of the transmission risk [21].

In Equatorial Guinea, there are 4 historical foci described: an insular focus, which is being eliminated [22] and 3 active continental foci (Kogo, Mbini and River Campo) [23]. The incidence of human trypanosomiasis cases in the country is currently very low, mainly, due to the active detection of cases and treatment [24]. There is so far no information about trypanosome infection in wild or peridomestic livestock on about the role that they may play as potential *T. b. gambiense* reservoirs.

In June 2002, a study was conducted in the Kogo and Mbini continental foci in order to determine the frequency of trypanosome infection in peridomestic livestock (goats, sheep and pigs) and to analyse the relationship between the abundance of the tsetse flies and the trypanosome infection in animals.

Methods

Study area

The Kogo district is in the south of the mainland region of Equatorial Guinea and borders on Gabon. The Kogo district has 9,535 inhabitants, 91.5% (8,723) of whom live in the rural area. The mainstay of the population of the Kogo district is artisanal fishing in the waters of the Muni estuary (confluence of three major rivers) (figure 1). The Mbini district is in the central region, a few kilometres from the capital of the mainland region, Bata. The Mbini district has 11,292 inhabitants, 83% (9,372) of whom live in the rural area. The population of Mbini lives of smallholdings (subsistence farming), artisanal fisheries and forestry. The fishing is fundamentally off coast, even though fishing also takes place on the River Wele, the main waterway (figure 1).

The villagers from Mbini and Kogo districts also breed livestock, fundamentally goats, sheep, pigs and hens. These animals are not in shed, but circulating around the dwellings cohabiting with inhabitants.

Detecting trypanosomes in animal samples

Sample collection

In June 2002, sampling was performed to determine the frequency of *Trypanosoma*

spp infection in peridomestic livestock in the villages located in the epicentre of the Kogo and Mbini foci.

Nearly eighty per cent of the animals registered in the zone were studied. Dried blood samples on filter paper (Whatmann No. 1-4) (1 ml) were collected by venopuncture from each animal for PCR assays. The samples were kept at 4°C until they were processed in the *Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais* (Lisbon, Portugal).

DNA Extraction

The blood was extracted from a portion of whatmann paper by adding 1 ml of a PBS+0.5% saponin solution and incubating it at 37°C for 1 hour. It was then centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes. The resulting supernatant was removed and 1 ml of PBS solution was added to each tube. Two incubation cycles at 4°C during 20 minutes followed by a centrifugation of 15 minutes at 14,000 rpm were performed. After each centrifugation, the supernatant was carefully removed and 1 ml of PBS added. Two hundred microliters of boiling Chelex 5% were added to each tube, mixed and incubated at 100°C during 10 minutes, with another short mix after 5 minutes. Tubes were then centrifuged at 14,000 rpm during 10 minutes and the supernatant transferred to a clean Eppendorf tube, where 45 µl of sodium acetate and 1 ml of absolute ethanol had been previously added. The mixture was vortexed and incubated at -20°C overnight. The tubes were centrifuged at 14,000 rpm for 15 minutes and the resulting supernatant was washed with a 70% ethanol solution. The tubes were centrifuged, after being rapidly vortexed, at 14,000 rpm for 10 minutes. The pellet was dried at 37°C and re-suspended in 15 µl of Tris+EDTA (TE).

Polymerase Chain Reaction

DNA from animal blood samples were pooled in groups of 4 for trypanosome detection and identification, optimizing time and costs. Each pool was composed of 1 µl of each animal blood. Whenever a pool yielded a positive amplification signal for the primers tested, each sample in that pool was individually tested to validate the result and to identify the positive sample(s). In this case, 1 µl of template DNA was used in PCR. All PCR assays were performed with a final volume of 25 µl of reaction mixture.

PCR assays with species-specific primers were performed according with the authors for *T. congolense* savannah [14] and *T. congolense* Kilifi [13] while the amplification conditions were modified for *T. congolense* forest PCR designed by Masiga et al. (1992) [13]: initial step of denaturation at 94°C for 5 minutes, followed by 35 cycles at

94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 5 minutes. For *T. brucei* the original amplification conditions, described by [25], were also modified: initial step at 95°C for 1 minute, followed by 40 cycles of 95°C for 1 minute, 55°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and final extension at 72°C for 10 minutes. *T. vivax* amplification was performed using the ILO1265 (forward primer) primer and by TVM R (primer reverse) primer designed by Masake et al. (1997) [26], using the conditions described by Morlais et al. (2001) [27].

All PCR products obtained were separated by electrophoresis in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed under UV illumination.

Entomological samplings

The mono-pyramidal trap was used, as it includes a system to collect and conserve the tsetse flies (collection bottle with 5% Formalin solution), allowing the determination and monitoring of the entomological parameters [28].

At the end of May 2002, 151 mono-pyramidal traps were distributed, 67 in the Kogo focus and 84 in Mbini. The traps were distributed at the locations considered to have the highest transmission risk, while taking into account the distribution of the cases over the last 5 years, lifestyle habits and activity of the patients. The traps were checked every two weeks, and tsetse flies were collected, counted and preserved in absolute ethanol. Subsequently, the Brunhes et al. (1998) key was used to determine the species in the reference laboratory [29].

Spatial and statistical analysis

The Chi-square test was used to compare the differences in the infection frequency of each parasite according to the study focus.

The apparent density per trap (AD), number of tsetse flies caught per trap and day, and the number of catches per trap and day were calculated in order to have an estimate of the relative tsetse fly abundance during the study period. The geographical position (longitude and latitude) of all the traps was recorded using a GPS receiver. Using this information, and the cartography (layers) for the study zone provided by INDEPROF (Institute of Forestry Promotion and Development, Equatorial Guinea), a GIS was developed. The Euclidean distance from each village to the nearest trap was calculated.

Logistic regression was used to calculate the Odds ratios (OR) of the distance and AD of the closest trap to each of the study sites, and animal species, as potential factors to

predict infection by *Trypanosoma* spp. In all cases, values of $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Given that *G. p. palpalis* populations can fly to 3 km from their breeding grounds [30], those villages that had traps placed at a greater distance from this dispersion limit were excluded.

Results

Infections by *Trypanosoma* spp in peri-domestic livestock

A total of 277 blood samples of peridomestic livestock were collected (159 in the Kogo focus and 118 in Mbini). 65.7% (182) of the samples were from goats, 27.8% (77) from sheep and 6.5% (18) from pigs. Goats were both the most abundant peridomestic animal as well as the ones with the highest infection rate of *Trypanosoma* spp. (42.3%), followed by pigs (27.8%) and sheep (20.8%).

T. brucei s.l. was responsible for the majority of infections in the tested animals, 32.7% in Mbini and 20.3% in Kogo with significant differences between foci ($X^2 = 5.2$, $p = 0.02$). The infection rate by *T. congolense* forest was 8.8% in Mbini, and 4.2% in Kogo ($p = 0.15$). Only 2 infections by *T. congolense* savannah were identified in the Mbini focus (1.3%) and 3 by *T. vivax* in the Kogo focus (2.5%) (table 1).

Six cases of mixed infections in goats were detected: *T. brucei* s.l./*T. congolense* forest in Mbini and *T. brucei* s.l./*T. vivax* in Kogo.

Entomological parameter study and relationship with livestock infection

During June 2002, a total of 10,224 tsetse flies were caught, 3,663 in the Kogo focus and 6,581 in the Mbini focus. *Glossina palpalis palpalis* was the most abundant tsetse species, 94.3% (3,453) in Kogo, and 68.6% (4,514) in Mbini. *Glossina tabaniformis*, 1.9% and 28.1%, and *Glossina caliginea*, 1.8% y 1.6%, were also caught, even though in smaller amounts, in Kogo and Mbini respectively.

The mean AD for *G. p. palpalis* was 1.9 (sd: 2.4) tsetse flies/traps/day, in the Kogo focus and 2.6 (sd: 3.4) in Mbini. In both foci, the number of females caught of this species was greater to the number of males, male/female ratio equal to 1.3 in Kogo and 1.6 in Mbini.

In Kogo, the traps closest to the villages where the animal blood samples were taken were at an average distance of 1,324.6 m (sd: 363.6), while the distance was less in Mbini, 795.1 m (sd: 1,009.1).

Table 2 shows the result of the multivariate logistic regression for the infection by *Trypanosoma* spp. Significant differences were found in the infection risk between the different animal species. Goats have a greater risk of infection than sheep (OR: 3). The tsetse fly apparent density is also associated with an increased risk of infection (OR: 1.58), in such a way that for each unit increase in the AD, the risk grows by 58%.

Discussion

Although animal trypanosomiasis is a severe constraint in African countries, few epidemiological studies performed on peridomestic animals in West Africa are available. For that reason, a study was conducted in Equatorial Guinea where 80% of the domestic animals in two HAT endemic foci (Kogo and Mbini) were sampled for trypanosoma presence analysis.

Molecular analysis of collected blood samples on filter paper revealed high infection rate of *T. brucei* s.l., followed by *T. congolense* forest and *T. vivax*, in both foci, with a global infection rate in the Mbini focus higher than in the Kogo focus, 42.8% and 27.1% respectively. Surprisingly, two of the pigs of the Mbini focus were infected with *T. congolense* savannah, which had not been reported in a nearby Fontem focus, Cameroon [31]. In entomological studies carried out in Mbini, *T. congolense* savannah DNA has been detected in *Glossina palpalis palpalis*, which would confirm the presence of this trypanosome in the zone (unpublished data, NSSCP).

Despite the high frequency of animals infected in these two foci no trypanosomiasis symptoms were recorded either at the time of conducting the sampling or various months afterwards. Previous findings have shown that infections by *T. congolense* and/or *T. brucei* s.l. are often asymptomatic [32].

The infection frequency by *T. congolense* forest and *T. vivax* noted in the Kogo and Mbini foci was significantly lower than the infection by *T. brucei* s.l., when compared to data from countries such as Liberia or the Democratic Republic of Congo [10,33]. However, the methodology used for detecting trypanosomes as well as the geographic regions and animal species frequency were different, which makes the comparison not easy to perform.

Furthermore, the majority of the studies involving peridomestic animals in this region of Africa have focused on *Trypanosoma* spp infections in pigs, due to their possible implication as *T. b. gambiense* reservoirs [31,34-36]. However, recent studies have

shown that other domestic animals, such as sheep and goats, may also be seriously affected by trypanosomiasis [37,38].

In Kogo and Mbini, although 27.8% of the pigs sampled were infected, mainly by *T. vivax* and *T. congolense*, there was a greater risk of infection in goats. This difference may be associated with the food preferences of the vector [39,40], or with the life habits of the different animal species. The circulation of animals through the points where there is a greater density of tsetse fly results in a greater risk of infection. Therefore, the more active animal species, such as goats, will be exposed to other species that have more sedentary habits.

In this study, the *T. b. gambiense* type I specific diagnostics was not performed. We therefore could not determine the role that these animals may play as human trypanosome reservoirs. In studies performed in Cameroon, the DNA of *T. b. gambiense* type I was isolated in wild [18,41] and domestic [31,42] non-human mammals. This is feasible if we take into account that the main vector in the zone, *Glossina palpalis palpalis*, may feed of animal and human blood [39,40]. Even though these infections could be considered to be accidental and transitory, the reduction in the prevalence of infection by *T. b. gambiense* type I in animals following the implementation of vector control activities and active case detection [18], must make us think of the importance that certain animal species may have in the upholding of historical foci in Central Africa.

From the entomological perspective, it was noted that the apparent density of the tsetse fly was associated with the risk of infection in domestic animals. The mean apparent density of the tsetse fly was higher in Mbini than in Kogo, and the distance from the traps (placed *a priori* in zones with a higher transmission risk) to the study sites was significantly lower in Mbini. This would explain the differences found in the infection frequency between the two foci. We should stand out the significance of the peridomestic transmission in villages of the Mbini focus, which has already been observed in other endemic foci [43], while the greatest risk of infection in Kogo would be in the sites close to the estuary waterways.

In Kogo and Mbini foci, it has been found a clear association between tsetse fly densities and trypanosome infection in livestock. Therefore, a well planned strategy focused on vectorial control would allow reducing trypanosome infection, not only in animals but also in humans.

Conclusions

The infection by *Trypanosoma* spp in peridomestic livestock is high in the mainland foci of Equatorial Guinea, particularly in Mbini. Furthermore, its geographical distribution and intensity is linked to the spatial distribution and density of the tsetse fly populations.

The high prevalence of *T. brucei* s.l. infection and the stagnation in the diagnosis of HAT cases in recent years (non-published data, NSSCP) leads us to consider the possible role of these animals as potential reservoirs of the human infection. In future studies, the presence of *T. b. gambiense* in wild and domestic animals needs to be confirmed and the permanence of these infections to be analysed, in order to clarify the role that certain animal species may play in maintaining these historical foci.

These studies should provide us with a better understanding of the epidemiology of sleeping sickness, of the cyclical resurgence, steady rate and extension of the disease.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions

JC was involved in the design of the survey, participated in the data, blood samples and tsetse flies collection, the interpretation of statistical analysis, and coordinated the draft of the manuscript. FF was involved in the molecular analysis and helped to draft the manuscript. MAD was performed the statistical analysis and interpretation, and drafted the manuscript. NN participated in the tsetse flies and blood samples collection. PN, JS, AB, JR and VR participated in the design of the surveys and helped to draft the manuscript. SCL participated in the design of the surveys, was involved in the molecular analysis and interpretation, and has given approval of the version to be published. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to thank the National Sleeping Sickness Control Program, the Republic of Equatorial Guinea's Ministry of Health and Social Welfare, for its technical support

during the study. Also, we would like to thank the Institute of Forestry Promotion and Development for provided the cartography to elaborate the GIS. This study was funded by the Spanish International Cooperation Agency for Development (AECID) and the Instituto de Salud Carlos III within the Network of Tropical Diseases Research Centers (RICET-RD06/0021). SCL is awarded a pos-doctoral grant of the Portuguese Foundation of Science and Technology. Molecular studies were financed by CMDT-LA.

Reference

1. Geerts S, Holmes PH: *Drug management and parasite resistance in bovine trypanosomiasis in Africa*. PAAT Technical and Scientific Series No. 1, PAAT Information Service Publication, FAO, Rome, 1998.
2. Van den Bossche P, Chigoma D: **Planning for the control of bovine trypanosomiasis in Southern Africa: a multidisciplinary approach. Livestock community and environment**. In *Proceedings of the 10th Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine*, Copenhagen. Denmark. 2001.
3. Swallow BM: **Impacts of trypanosomiasis on African agriculture**. PAAT Technical and Scientific Series No. 2. PAAT Information Service Publication, FAO, Rome, 2000.
4. Murray M, Stear MJ, Trail JCM, d'Ieteren GDM, Agyemang K, Dwingler RH: **Trypanosomiasis in cattle: prospects for control**. In *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*. Edited by Owen JB & Axford RFE; CAB International, Wallingford; 1991:203-223.
5. Winrock International: *Assessment of Animal Agriculture in Sub-Saharan Africa*. Winrock International Institute for Agriculture Development Morrilton, USA; 1991.
6. WHO, 1998: *WHO Report on Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis*. World Health Organization, Geneva; 1998.
7. Allsop R: **Options for vector control against trypanosomiasis in Africa**. *Trends Parasitol* 2001, **17**:15-19.
8. Gibson W: **Will the real *Trypanosoma brucei rhodesiense* please step forward?** *Trends Parasitol* 2002, **18**:486-490.

9. WHO, 2001: *Report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases – African trypanosomiasis*. World Health Organization, Geneva; 2001.
10. Mehlitz D: **Trypanosome infections in domestic animals in Liberia**. *Tropenmed Parasitol* 1979, **30**:212-219.
11. Penchenier L, Grebaut P, Ebo'O Eyenga V, Bodo JM, Njiokou F, Binzouli JJ, Simarro P, Soula G, Laveissière C: **Le foyer de trypanosomiase de Campo (Cameroun). Historique et situation de l'endémie en 1998**. *Bull Soc Pathol Exot* 1999, **92**:185-190.
12. Hoare CA: *The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph*. Blackwell Scientific Publications: Oxford, UK;1970.
13. Masiga DK, Smyth AJ, Hayes P, Bromidge TJ, Gibson WC: **Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification**. *Int J Parasitol* 1992, **22**:909-918.
14. Majiwa PAO, Thatthi R, Moloo SK, Nyeko JHP, Otieno LH, Maloo S: **Detection of trypanosomes infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenaemic but aparasitaemic cattle**. *Parasitology* 1994, **108**:313-322.
15. Malele I, Lehane M, Gibson WC: **The use of specific and generic primers to identify trypanosomes infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR**. *Infect Genet Evol* 2003, **3**:271-279.
16. Kyambadde JW, Enyaru JCK, Matovu E, Odiit M, Carasco JF: **Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction**. *Bull WHO* 2000, **78**:119-124.
17. Solano P, Jamonneau V, N'Guessan P, N`Dri L, Dje NN, Miezán TW, Lejon V, Büscher P, Garcia A: **Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human Trypanosomiasis**. *Acta Trop* 2002, **82**:349-356.
18. Njiokou F, Laveissière C, Simo G, Nkinin S, Grébaut P, Cuny G, Herder S: **Wild fauna as probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon**. *Infect Genet Evol* 2006, **6**:147-153.
19. De Raadt P: *The history of sleeping sickness*. Edited by Gillies HM. London: Protozoal Diseases; 1999.

20. Kuzoe FAS, Schofield CJ: **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.*; 2004.
21. WHO, 1986: *Epidemiology and Control of Human African Trypanosomiasis. Report of WHO Expert Committee on Sleeping Sickness.* World Health Organization, Geneva, Technical Report Series 739; 1986.
22. Simarro PP, Franco JR, Ndongo P, Nguema E, Louis FJ, Jannin J: **The elimination of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea.** *Trop Med Int Health* 2006, 5:636-646.
23. Penchenier L, Simarro P, Ndong-Asumu P: **Historique et evolution de la maladie du sommeil en Guinee Equatoriale.** *Bull Liais doc OCEAC* 1996, 29:69-74.
24. WHO, 2006: *Human African Trypanosomiasis (sleeping sickness): epidemiological update.* Weekly Epidemiological Record 81. World Health Organization, Geneva, 2006.
25. Moser DR, Cook GA, Ochs DE, Baily CP, McKana MR, Donelson JE : **Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction.** *Parasitology* 1989, 99:57-66.
26. Masake RA, Majiwa PAO, Mooloo SK, Makau JM, Njuguna JT, Maina M, Kabata J, Ole-MoiYoi OK, Nantulya VM: **Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction.** *Exp Parasitol* 1997, 85:193-205.
27. Morlais I, Ravel S, Grebaut P, Dumas V, Cuny G : **New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification.** *Acta Trop* 2001, 80:207-213.
28. Gouteaux JP, Lancien J: **The piramidal trap for collecting and controlling tsetse flies (Diptera: Glossinidae). Comparative trials and description of new collecting technics.** *Trop Med Parasitol* 1986, 37:61-66.
29. Brunhes J, Cuisance D, Geoffroy B, Hervy JP, Lebbe J: *Les glossines ou mouches tsé-tsé. Logiciel d'identification.* Glossine Expert. Manuel illustré d'utilisation, Cirard, Université Paris – VI, ORSTOM, Paris; 1998.

30. Nash TAM, Page WA: **On the ecology of *Glossina palpalis* in northern Nigeria.** *Trans R Entomol Soc Lond* 1953, **104**:71–170.
31. Simo G, Asonganyi T, Nkinin SW, Njiokou F, Herder S: **High prevalence of *Trypanosoma brucei gambiense* group 1 in pigs from the Fontem sleeping sickness focus in Cameroon.** *Vet Parasitol* 2006, **139**:57-66.
32. Ilemobade AA, Balogun TF: **Pig trypanosomiasis: effects of infection on feed intake, liveweight gain and carcass traits.** *Trop Anim Health Prod* 1981, **13**:128-36.
33. Makumyaviri A, Mehlitz D, Kageruka P, Kazyumba GL, Molisho D: **Animal reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in Zaire: trypanosome infections in two foci in Bas-Zaire.** *Trop Med Parasitol* 1989, **40**:258-262.
34. Gibson WC, Mehlitz D, Lanham S, Godfrey DG: **The identification of *Trypanosoma brucei gambiense* in Liberian pigs and dogs by isoenzymes and by resistance to human plasma.** *Tropenmed Parasitol* 1978, **29**:335-345.
35. Mehlitz D: **Le reservoir Animal de la Maladie du Sommeil à *Trypanosoma brucei gambiense*.** Etudes et Synthèses de L'I.E.M.V.T, France; 1986.
36. Nkinin SW, Njiokou F, Penchenier L, Grébaut P, Simo G, Herder S: **Characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. subspecies by isoenzymes in domestic pigs from Fontem sleeping sickness focus of Cameroon.** *Acta Trop* 2002, **81**:225-232.
37. Scott JL, Frezil A, Toudic A, Godfrey DG: **A sheep as potential reservoir of human trypanosomiasis in the republic of the Congo.** *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983, **77**:397-401.
38. Ng'ayo MO, Njiru ZK, Kenya EU, Muluvi GM, Osir EO, Masiga DK: **Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya: important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness?.** *Kineto Biol Dis* 2005, **45**:1-7.
39. Laveissière C, Couret D, Staak C, Hervouet JP: ***Glossina palpalis* et ses hôtes en secteur forestier de Côte d'Ivoire. Relation avec l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine.** *Cah ORSTOM Sér Ent Méd Parasitol* 1985, **23**:297-303.

-
40. Njiokou F, Simo G, Mbida Mbida A, Truc P, Cuny G, Herder S: **A study of host preference in tsetse flies using a heteroduplex PCR method.** *Acta Trop* 2004, **91**:117-120.
 41. Herder S, Simo G, Nkinin S, Njiokou F: **Identification of trypanosomes in wild animals from Southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR).** *Parasite* 2002, **9**:345-349.
 42. Asonganyi T, Sede MJ, Ngu JL: **Trypanosomiasis in Mbam division, Cameroon: parasitological and immunodiagnosis examination of the domestic animal population.** *Ann Univ Sci Santé* 1986, **3**:181-189.
 43. Laveissière C, Couret D, Hervouët JP: **Localisation et fréquence du contact homme/glossine en secteur forestier de Côte d'ivoire, Recherche des points épidémiologiquement dangereux dans l'environnement végétal.** *Cah ORSTOM Sér Ent Méd Parasitol* 1986, **24** :21-35.

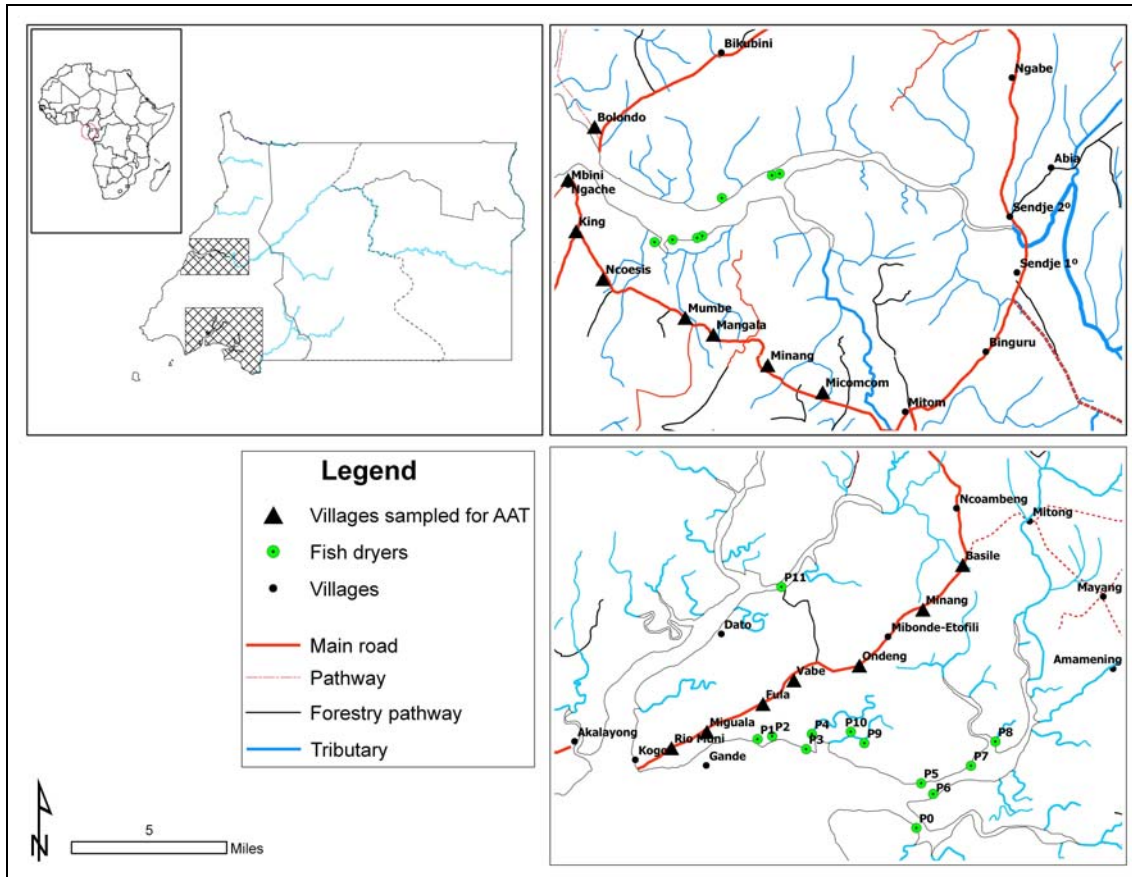


Figure 1. Map of Kogo and Mbini foci: distribution of sampled villages for the study of *Trypanosoma* spp infection in cattle

Foci	Species	<i>T. brucei</i> s.l. % (n)	TcF % (n)	TcS % (n)	<i>T. vivax</i> % (n)	Global % (n)
Mbini (n = 159)		32.7% (52)	8.8% (14)	1.3% (2)	-	42.8% (68)
Kogo (n = 118)		20.3% (24)	4.2% (5)	-	2.5% (3)	27.1% (32)

Table 1. Infection rate in peridomestic animals by the different trypanosome species in the Kogo and Mbini foci (PCR-SPP)

Predictors	<i>Trypanosoma spp</i>		
	N	OR	95% CI
Livestock	Sheep	15	1 -
	Coat*	72	3.08 1.54 - 6.1
	Pig	5	1.63 0.49 - 5.4
*Apparent density <i>Glossina spp</i> (mean±sd)		1.56 ±1.52	1.58 1.21 - 2
*Trap distance (km) to sampled villages (mean±sd)		0.91 ±0.92	0.49 0.32 - 0.8

*p<0.05

Table 2. Potential factors to predict infection by *Trypanosoma spp* in the Kogo and Mbini foci

V. DISCUSION GENERAL

Trampas piramidales como estrategia de control vectorial

Las trampas piramidales han resultado ser un instrumento eficaz para reducir la densidad de las poblaciones de mosca tsetse y analizar la distribución espacial del vector de la tripanosomiasis (*G. p. palpalis*) en los focos de Kogo y Mbini. Los resultados de este estudio estarían en consonancia con lo observado en otras regiones de Guinea Ecuatorial ([Simarro y col., 1991](#); [Simarro y col., 2000](#)) y en países vecinos ([Gouteux y Lancien, 1986a](#); [Gouteux y Lancien, 1986b](#); [Abel y col., 2004](#)).

Las actividades de control vectorial van encaminadas a reducir el contacto hombre-vector. En el caso de la tripanosomiasis, ese control se lleva a cabo mediante la disminución progresiva de las poblaciones de mosca tsetse, ya sea por métodos físicos (empleo de trampas, alterando el ecosistema del vector), químicos (fumigación extensiva, rociamiento de trampas) y/o genéticos (esterilización de las poblaciones introduciendo machos irradiados) ([Kuzoe y Schofield, 2004](#)).

El éxito de las campañas de control vectorial radica en la baja tasa de reproducción de las glossinas ([Leak, 1998](#)). La eliminación de ejemplares adultos se traduce, a lo largo del tiempo, en una disminución progresiva de la población de mosca tsetse y, en consecuencia, en una reducción del contacto hombre-vector ([Rogers y col., 1985](#)).

Por tanto, aunque la base del control de la enfermedad del sueño es la esterilización del reservorio, el empleo de medidas prácticas y simples para reducir el contacto hombre-vector es clave para asegurar un control rápido en las zonas de elevada transmisión ([Abel y col., 2004](#)).

El lucha antivectorial se ha mostrado especialmente útil en el control de la tripanosomiasis por la forma rhodesiense, puesto que el reservorio principal de la infección son mamíferos no humanos. Sin embargo, también hay numerosas experiencias de control con trampas en áreas de transmisión de *T. b. gambiense* ([Gouteux y Lancien, 1986a](#); [Gouteux y Lancien, 1986b](#); [Simarro y col., 1990](#); [Laveissière y Grébaud, 1990](#)).

Durante los años 80, se llegó a controlar la epidemia de THA en Uganda, combinando el diagnóstico y tratamiento de casos con el empleo de trampas impregnadas y la fumigación con insecticidas no residuales ([Lancien, 1991](#); [Allsopp, 2001](#)). Estudios

llevados a cabo en focos de Congo, Camerún y Costa de Marfil, donde el vector principal es *G. p. palpalis*, las trampas mostraron ser altamente eficaces en el control de la transmisión, reduciendo la densidad y vida media de las poblaciones vectoras ([Eouzan y Ferrara, 1978](#); [Lancien, 1981](#); [Laveissière y Couret, 1981](#)).

Trampas piramidales como instrumento para monitorizar la estrategia de control vectorial

Como comentamos anteriormente (ver Material y Métodos), algunos tipos de trampa incorporan un sistema de recolección que facilita la determinación de ciertos parámetros entomológicos y permite monitorizar el impacto de la actividad de control vectorial sobre la distribución y densidad de las poblaciones vectoras. La reducción del tamaño poblacional es un claro indicador de la eficacia de la estrategia de control.

La estimación del tamaño absoluto de las poblaciones de mosca tsetse plantea muchas dificultades. A pesar de todo, es necesario establecer estimaciones y modelos de dinámica poblacional para poder evaluar, en última instancia, la eficacia real de las estrategias de control vectorial realizadas.

Para algunos autores, la mejor manera de determinar el tamaño de una población es mediante técnicas de marcaje, liberación y recaptura ([Jackson, 1953](#); [Hargrove y Borland, 1994](#)). Este método consiste en capturar un número determinado de glossinas, marcarlas con determinados colorantes, liberarlas y, pasado un tiempo, llevar a cabo capturas en la zona de liberación, y en otros puntos distantes. De esta manera, además de determinar la densidad de una población, podemos evaluar la capacidad de dispersión. Este método se basa en el supuesto de que las moscas marcadas se mezclan de manera completa y aleatoria en la población general y que todos los individuos tienen la misma probabilidad de ser capturados. Esto resulta bastante impreciso, teniendo en cuenta que son muchos los factores que condicionan el tamaño de una población de glossinas no aislada (factores climáticos, factores intrínsecos de las especies vectoras...). Por otra parte, si diéramos por válidos esos supuestos, para poder llegar a tener una estimación del tamaño poblacional sería preciso llegar a capturar, marcar y liberar un gran número de glossinas. Se podría minimizar el error llevando a cabo muestreos consecutivos en diferentes momentos ([Hargrove y Borland, 1994](#)).

Generalmente, las capturas se llevan a cabo de manera manual en un transecto establecido de longitud variable. Este método de recolección no es válido para la captura

de todas las especies de glossinas. En la actualidad, se sabe que algunas especies escapan ante la presencia humana ([Vale, 1969](#)). Sustancias liberadas de manera natural por la piel (p.e. ácido láctico), tienen un efecto repelente hacia las hembras de ciertas especies. Este es el caso de algunos vectores importantes pertenecientes al grupo *morsitans* ([Hargrove, 1991](#)).

Otros autores han optado por emplear trampas para llevar a cabo estimaciones del tamaño poblacional ([Zippin, 1956](#); [Ryan y col., 1981](#); [Gouteux y Lancien, 1986b](#)). En este caso, se parte de dos supuestos: que la población está aislada, y que la captura supone una progresiva disminución de los individuos capturados en sucesivas recolecciones. Se asume que la población es estacionaria, que la probabilidad de captura durante un periodo de tiempo determinado es el mismo para todas las trampas, y que dicha probabilidad es, además, constante.

En los estudios llevados a cabo en los focos endémicos de tripanosomiasis de Kogo y Mbini se ha empleado la densidad aparente (DA) como indicador del tamaño relativo de las poblaciones vectoras. Este indicador, hace referencia al número de capturas de moscas tsetsé por trampa, durante un periodo determinado de tiempo. Aunque la densidad aparente *per se*, no tiene porqué corresponderse con el tamaño absoluto de las poblaciones de glossinas, establecida a lo largo del tiempo constituye un indicador válido para determinar el impacto de las trampas sobre la densidad de las poblaciones en el contexto de una campaña de control vectorial.

Trampas piramidales en los focos de Kogo y Mbini, y dinámica poblacional de *Glossina palpalis palpalis*

Un reto de la campaña de control en Kogo y Mbini fue emplear las trampas de manera no extensiva, sino como un instrumento de protección en las zonas previamente identificadas como de mayor riesgo de transmisión. Estas zonas fueron delimitadas teniendo en cuenta: la distribución de los casos en los últimos 5 años, el tipo de actividad desarrollada por los pacientes (pesca, caza, agricultura) y los lugares frecuentados. Esta metodología de empleo de trampas es inusual en el control de los vectores de la tripanosomiasis. De hecho, se considera que la densidad de trampas debe venir determinada por la abundancia local de mosca tsetsé, así como por la capacidad de dispersión de las especies presentes en la zona ([Kuzoe y Schofield, 2004](#)). Para el control de las glossinas vectoras ribereñas, como es el caso de *Glossina palpalis*, se considera óptima la

distribución de 10 trampas por kilómetro lineal, aunque también se han observado buenos resultados empleando 1 trampa cada 300 metros ([Laveissière y Grébaud, 1990](#)).

En el foco de Kogo, teniendo en cuenta que la zona de estudio tiene una superficie total de aproximadamente 926,98 km², la densidad de trampas alcanzada fue de 0,08 trampas por km². En el foco de Mbini, para una superficie total de 473,04 km², la densidad de trampas fue de 0,15 trampas por km². Si tuviéramos en cuenta un estándar de densidad de trampas para el control de *Glossina palpalis* de 33,3 trampas por km² ([Laveissière y Grébaud, 1990](#)), en el foco de Kogo se deberían haber distribuido un total de 30.868 trampas y en Mbini 15.752.

Poner en marcha una estrategia de control con este número de trampas resulta poco factible, tanto desde un punto de vista técnico como logístico (recursos humanos y materiales). Además, sabemos que la distribución y densidad de las poblaciones de mosca tsetse no son homogéneas, ni en el espacio ni en el tiempo.

Es posible que la baja densidad de trampas haya sido la causa principal de que, a pesar de la disminución progresiva y significativa de la DA para las tres especies presentes en los focos de Kogo y Mbini, se observara un incremento notable de las capturas de *G. p. palpalis* en diferentes momentos del estudio. Sin embargo, dado que la evolución de la DA de esta especie vectora sigue patrones diferentes en cada uno de los focos (**Figura 2**, artículo 2; **Figura 1**, artículo 1), debemos valorar otras hipótesis.

La DA de *G. p. palpalis* en el foco de Mbini durante los meses de estudio fue baja como consecuencia de la actividad de control que se lleva realizando desde el año 2002. En los primeros meses de actividad el número de capturas descendió bruscamente, aunque al finalizar el segundo año se observó una recuperación progresiva de las poblaciones de *G. p. palpalis* (**Figura 2**, artículo 2). El incremento en el número de trampas caídas, rotas o desaparecidas, fundamentalmente en localidades donde se observó una mayor resistencia de la población hacia las actividades de control, podría ser una de las causas de esta recuperación. La disminución brusca del número de trampas operativas (desde 0,15 a 0,10 trampas/km²) tuvo lugar a mediados del segundo año de estudio y se atribuye a la llegada de individuos de zonas no endémicas, poco sensibilizados con la enfermedad y las estrategias de control. Por esta razón, resulta indispensable sensibilizar e implicar a las comunidades en las actividades de control vectorial, que siempre deben estar supervisadas y controladas por personal

cualificado ([Kuzoe y Schofield, 2004](#)).

Sin embargo, como observamos en los modelos predictivos generados a partir del análisis espacial, el incremento en la DA de *G. p. palpalis* se da, principalmente, en la parte alta del río Wele (**Figura 3 y 5**, artículo 1). Esta zona fue clasificada al inicio de la actividad de bajo riesgo de transmisión, debido a la escasez de asentamientos humanos. Por esta razón, el número de trampas piramidales situadas en esta zona fue baja (30,5% del total), en comparación con las localidades del epicentro del foco.

Todo apunta a que, en el foco de Mbini, la baja densidad de trampas, especialmente en la parte alta del río Wele, así como la disminución del número de trampas operativas, pudieran haber sido las principales causas de la recuperación de las poblaciones de *G. p. palpalis* al finalizar el segundo año de estudio.

Por otra parte, [Nash \(1953\)](#) observó que las poblaciones de *G. p. palpalis* pueden llegar a desplazarse hasta 3 Km desde sus lugares de cría, y que durante los periodos de lluvias es frecuente la dispersión de las poblaciones siguiendo los cauces fluviales ([Nash, 1937](#)). Este comportamiento permitiría la extensión y recolonización desde zonas no tratadas o con menor presión (menor densidad de trampas), aspectos que no fueron tenidos en cuenta en la implementación del control con trampas en los dos focos.

En el foco de Kogo, la hipótesis de la recolonización desde zonas no tratadas vendría reforzada por el incremento de capturas de moscas tsetsé de mayor edad (machos y hembras) durante los dos picos de DA observados, más marcado al finalizar el primer periodo de lluvias (**Figura 6**, artículo 2). Además, las superficies de predicción generadas para la DA estacional muestran una clara concentración de las poblaciones de *G. p. palpalis* durante los periodos de sequía, mientras que en las estaciones lluviosas parece darse una mayor homogeneidad en la distribución como consecuencia, posiblemente, de este fenómeno de dispersión (**Figura 3 y 4**, artículo 2). Sin embargo, existen dudas respecto al origen de estas recolonizaciones. Es posible que hayan tenido lugar desde zonas no tratadas dentro del foco como consecuencia de la distribución selectiva de las trampas, aunque también es posible que haya tenido lugar desde el vecino Gabón, donde no hay constancia de que se estén llevando a cabo actividades de control vectorial.

Como podemos observar, son numerosos factores los que determinan la distribución y densidad de las poblaciones de mosca tsetsé. En el foco de Kogo, hemos visto la

influencia marcada de factores climatológicos (pluviometría) sobre la distribución espacial y comportamiento de las poblaciones de *G. p. palpalis*. El hábitat resulta un factor menos determinante en este foco, debido a la gran homogeneidad existente en la zona. Hay un dominio claro del manglar, sobre otras coberturas vegetales, en las orillas de los cauces fluviales que conforman el estuario del Río Muni. La disponibilidad de huéspedes potenciales (población dedicada a la actividad pesquera) en los secaderos de pescado y embarcaderos determinaría, en gran medida, una mayor concentración de las poblaciones de mosca tsetsé en estos puntos. Por tanto, cabe esperar que la puesta en marcha de actividades de control vectorial en estas zonas traiga consigo una reducción significativa de la transmisión de la tripanosomiasis. Como nos muestra la **Figura 7** (artículo 2), tras la puesta en marcha de las actividades de control vectorial en el año 2002 se observa una reducción notable del número de casos diagnosticados en el foco de Kogo (datos no publicados, PNCTHA).

Sin embargo, una reducción similar en la transmisión no ha sido observada en Mbini (datos no publicados, PNCTHA).

Las primeras encuestas entomológicas llevadas a cabo en el foco de Mbini al comienzo de la campaña de control vectorial (año 2002), demostraron la presencia de *G. p. palpalis* en una gran variedad de hábitat, incluyendo el área peridoméstica (dentro de los poblados del foco). El diagnóstico de tripanosomiasis en personas incapacitadas (datos no publicados, PNCTHA), y la ausencia de población asentada en las orillas del río Wele (principal cauce fluvial en el distrito), hizo pensar en la importancia de la transmisión peridoméstica en Mbini. Un estudio llevado a cabo en el foco de Ombessa, en el vecino Camerún, demostró el comportamiento peridoméstico de *G. p. palpalis* y la influencia de este comportamiento excepcional sobre el patrón de transmisión de la tripanosomiasis en la zona ([Eouzan y Ferrara, 1978](#)).

Por esta razón, en los primeros años de la campaña de control vectorial se concentraron la mayor parte de las trampas en la periferia de las localidades del epicentro del foco (**Figura 6**, artículo 1). Dos años más tarde, vemos como la DA para *G. p. palpalis* ha disminuido notablemente en charcas y pozos de las localidades del epicentro, al igual que en los pequeños embarcaderos de ríos que circundan dichas localidades (**Figura 2**, artículo 1). En cambio, se mantiene relativamente alta en secaderos de pescado y embarcaderos a orillas del río Wele.

La emigración hacia áreas despobladas trae consigo una serie de cambios sobre los ecosistemas que pueden favorecer el desplazamiento (alejamiento) de las poblaciones

de mosca tsetsé ([Odiit y col., 2006](#)). [Morris \(1951\)](#) observó que una reducción del hábitat de la mosca tsetsé, especialmente por la eliminación de la vegetación ribereña, puede llevar a una disminución sostenida del riesgo de infección. Por contra, los movimientos poblacionales, como por ejemplo los derivados de una actividad económica, se convierten en un factor de riesgo puesto que supone la entrada de huéspedes potenciales humanos en el hábitat natural del vector ([Laveissière y col., 1986](#); [Courtin y col., 2005b](#)). En los estudios llevados a cabo en el foco insular de Luba, se observó un mayor número de casos en población adulta que trabajaba en las plantaciones de cacao, hábitat de *G. p. palpalis* en la isla ([Simarro y col., 1990](#)).

Como comentamos anteriormente, en el segundo año se observa una recuperación de la DA de *G. p. palpalis* en el tramo alto del río Wele como consecuencia, probablemente, de la baja densidad de trampas en esta zona. Este hecho contribuiría a que los secaderos de pescado y embarcaderos sean las zonas de mayor riesgo de contacto con el vector, incluso después de un año de actividad con las trampas. Estas zonas se caracterizan por la predominancia del manglar y bosque ribereño, hábitat idóneo para el principal vector de la tripanosomiasis en África Central ([Laveissière y Penchenier, 2000](#)).

Por tanto, a pesar de la baja densidad de mosca tsetsé en secaderos de pescado y embarcaderos, la población que desarrolla algún tipo de actividad en estas zonas (pescadores, fundamentalmente) estaría más expuesta a la infección.

Análisis espacial y sistemas de información geográfica para generar modelos predictivos de densidad y distribución de *G. p. palpalis*

La principal dificultad técnica que plantea el control de las poblaciones de mosca tsetsé es la extensión y heterogeneidad de las áreas que deben ser tratadas. Es necesaria una adecuada definición de los límites geográficos de la población diana para determinar la escala de la intervención. Así, en intervenciones a pequeña escala suele darse la rápida reinvasión desde áreas circundantes en cuanto las actividades de control se interrumpen o pierden intensidad. En intervenciones a gran escala el problema es similar, al menos que se consiga erradicar completamente a la población vectora ([Malavasi y col., 2004](#)).

La accesibilidad a toda el área donde el vector está presente, constituye un aspecto determinante para garantizar el éxito de una campaña de control vectorial con trampas.

En el Delta del Okavango, norte de Botswana, el control de las moscas tsetsé (*Glossina morsitans centralis*) ha sido siempre la primera línea de defensa frente a la

tripanosomiasis humana y animal ([Allsopp y Phillemon-Motsu, 2002](#)). Hasta el año 1991, el control de la zona se llevaba a cabo mediante la fumigación aérea y terrestre. Tras la inclusión del Delta del Okavango en la lista de humedales de mayor importancia internacional, el empleo de pesticidas fue interrumpido dando paso a una estrategia de control con pantallas tratadas con insecticidas y trampas con atrayentes ([Allsopp, 1998](#)). Sin embargo, los problemas asociados al empleo de trampas y pantallas fueron patentes al poco tiempo de comenzar la campaña. Por un lado, había áreas remotas que resultaban inaccesibles (humedales y pantanos), y otras tantas a las que únicamente se podía acceder en ciertos momentos del año (coincidiendo con el periodo de sequía). Además, la fauna salvaje dañaba las trampas con frecuencia.

El programa de control fue interrumpido, y a los pocos meses se produjo la reinvasión de áreas que habían permanecido libres de mosca tsetsé desde la década de los 70. Inevitablemente, la tripanosomiasis reapareció en el ganado doméstico de la periferia del Okavango (300 animales muertos hasta mediados del año 2000).

Tras el fracaso de la estrategia implementada en el año 1991, el gobierno de Botswana tomó la decisión de volver a la fumigación aérea secuencial con deltametrina, insecticida más respetuoso con el medio ambiente. Las trampas y pantallas distribuidas fueron realineadas formando una barrera de 15-20 Km de ancho en la frontera sur del Okavango, con el fin de prevenir la reinvasión ([Allsopp y Phillemon-Motsu, 2002](#)).

Sirva de ejemplo la experiencia en el Delta del Okavango para imponer una mayor racionalización en el diseño de las estrategias de control vectorial, a lo que puede contribuir de manera significativa el desarrollo de los sistemas de información y análisis espacial.

En nuestro caso, el análisis espacial de las capturas de mosca tsetsé realizadas con las trampas piramidales en los focos de Kogo y Mbini ha servido para mejorar el conocimiento de las dinámicas poblacionales de *G. p. palpalis* y llegar a identificar las zonas en las que hay un mayor riesgo de contacto hombre-vector. El conocimiento generado a partir de estos estudios permitirá en el futuro mejorar la relación coste-eficacia de las intervenciones y optimizar los recursos disponibles a nivel del PNCTHA.

El empleo selectivo e intensivo de trampas en zonas de mayor riesgo de contacto, dejando de lado otras zonas donde el vector podría estar también presente, reforzará las actividades de control sobre el reservorio humano llevadas a cabo de manera rutinaria por el PNCTHA con un mínimo incremento del coste global de las actividades de

prevención.

La identificación de estas zonas de mayor riesgo de contacto con *G. p. palpalis* ha sido posible gracias a la aplicación de técnicas de interpolación espacial sobre la información recogida a partir de muestreos puntuales. Este tipo de técnica ha sido empleada con éxito para elaborar mapas de riesgo en diversas enfermedades transmitidas por vectores, como es el caso del Virus del Oeste del Nilo, transmitida por culicinos ([Ryan y col. 2004](#)), o la enfermedad de Lyme, transmitida por garrapatas ([Dennis y col., 1998](#)).

Sin embargo, la aplicación de técnicas de extrapolación e interpolación de datos para el estudio de la distribución espacial de las especies vectoras debe llevarse a cabo con cautela. En ocasiones, el empleo inadecuado de estas técnicas puede llevarnos a generar más información, errónea en muchos casos, que la proporcionada por los propios datos ([Kitron, 2000](#)). Los modelos predictivos, o probabilísticos, obtenidos a partir de estas técnicas representan la conversión de observaciones puntuales espacialmente referenciadas, en una superficie continua donde la variable de interés es estimada para localizaciones no muestreadas ([Nansen y col., 2003](#)). Para poder aplicar estas técnicas de interpolación (*kriging*, fundamentalmente), es importante analizar y caracterizar previamente la estructura espacial de los datos ([Ryan y col., 2004](#)).

Tanto en Kogo como en Mbini, la distribución de las trampas no fue aleatoria y tampoco se llevó a cabo siguiendo criterios de uniformidad y representatividad espacial. La distribución uniforme de las localizaciones de muestreo permite recoger mejor la variabilidad espacial de los datos y mejora sustancialmente la calidad de las estimaciones ([Ryan y col., 2004](#)). De manera que el error de interpolación será mayor a medida que nos alejemos de las zonas donde se haya concentrado el muestreo. Además, deberemos tener en cuenta la distancia máxima de autocorrelación de los datos para establecer la distancia de interpolación. Estos factores deben ser considerados a la hora de interpretar los mapas de predicción. Por consiguiente, el empleo de las trampas para la vigilancia y estudio entomológico puede requerir criterios de distribución diferentes a los empleados para el control, máxime cuando se van a aplicar herramientas de análisis espacial, como el *kriging*.

A pesar de todo, la **Tabla 3** (artículo 1), para los modelos generados en el foco de Mbini, y la **Tabla 2** (artículo 2), para los modelos generados en el foco de Kogo, nos muestran que la calidad de las superficies de predicción de la DA estacional y anual para *G. p. palpalis* es, en general, buena, especialmente para el segundo año de estudio.

Control y erradicación de la mosca tsetsé en los focos de Kogo y Mbini

La actividad de control vectorial con trampas en Kogo y Mbini ha mostrado ser eficaz en reducir la densidad de las poblaciones de *G. p. palpalis*, aunque son necesarios mayores esfuerzos para mejorar los resultados en el foco de Mbini y evitar la recolonización desde el tramo alto del río Wele.

El empleo de trampas para el control y erradicación de las poblaciones vectoras de la tripanosomiasis resulta bastante complejo. Como vimos anteriormente, para garantizar *a priori* una buena presión sobre las poblaciones de mosca tsetsé es necesario emplear un número bastante elevado de trampas ([Laveissière y Grébaut, 1990](#)), lo cual trae consigo un esfuerzo técnico y logístico considerable. Además, es necesario tener en cuenta la etología del vector para seleccionar la trampa idónea. Esto se complica aún más, cuando en un área endémica conviven más de una especie vectora con hábitos de vida (alimenticios, de reposo...) marcadamente diferentes.

Aunque *G. p. palpalis* es la especie predominante en la zona, la coexistencia con otra especie antropofílica (*G. caliginea*) dificultaría la puesta en marcha de estrategias tendentes a la erradicación, como la liberación de individuos (machos) estériles ([Molyneux, 2001](#)). En Kogo y Mbini, mediante el empleo de trampas, no sólo se ha logrado reducir significativamente la densidad de la principal especie vectora sino que, además, se ha reducido de manera notable la diversidad de poblaciones de mosca tsetsé. Así, tras dos años de actividad la presencia de *G. caliginea* en la zona es prácticamente imperceptible. Este tipo de acción facilitaría, en un futuro, la puesta en marcha de actividades de erradicación.

Tripanosomiasis Animal en Kogo y Mbini

La frecuencia de infección por tripanosoma en ganado peridoméstico es alta en las localidades del epicentro de los focos continentales de Guinea Ecuatorial, al igual que ocurre en otros países de la subregión ([Mehlitz y col., 1986](#); [Asonganyi y col., 1986](#)).

Sin embargo, la frecuencia de infección por *T. congolense* forest y *T. vivax* observada en los focos de Kogo y Mbini resultó ser significativamente menor que la infección por *T. brucei* s.l., al contrario de lo observado en países como Camerún, Liberia o la República Democrática del Congo ([Simo y col., 2006](#); [Mehlitz y col., 1979](#); [Makumyaviri y col., 1989](#)). Además, en Mbini se diagnosticaron dos infecciones por *T. congolense* savannah, ausente en el cercano foco de Fontem, Camerún ([Simo y col., 2006](#)). En

estudios entomológicos llevados a cabo en Mbini, se ha detectado ADN de *T. congolense savannah* en *G. p. palpalis* (datos no publicados, PNCTHA), lo cual confirmaría la presencia de este tripanosoma en la zona.

Algunos animales estudiados estaban infectados por más de una especie de tripanosoma, hecho que ya ha sido descrito con anterioridad ([Makumyaviri y col., 1989](#); [Jamonneau y col., 2004](#)).

La mayor parte de los trabajos llevados a cabo con ganado peridoméstico en esta región de África se han centrado en estudiar las infecciones por *Trypanosoma* sp en cerdos y su posible implicación como reservorios de *T. b. gambiense* ([Gibson y col., 1978](#); [Mehlitz y col., 1986](#); [Nkinin y col., 2002](#); [Simo y col., 2006](#)). Sin embargo, hay estudios que demuestran que otros animales domésticos, como ovejas y cabras, también pueden ser gravemente afectadas por la tripanosomiasis ([Ng'ayo y col., 2005](#)). En Kogo y Mbini, aunque un 27,7% de los cerdos estudiados estaban infectados, principalmente por *T. vivax* y *T. congolense*, se observó un mayor riesgo de infección en las cabras. Esta diferencia podría estar asociada con las preferencias alimenticias de las glosinas vectoras ([Laveissière y col., 1985](#); [Njiokou y col., 2004](#)), o con los hábitos de vida de las diferentes especies animales. La circulación de animales por los puntos donde hay una mayor densidad de mosca tsetsé supone un mayor riesgo de infección. Por tanto, aquellas especies animales más activas, como pueden ser las cabras, podrían estar más expuestas que otras que tengan hábitos más sedentarios.

A pesar de la elevada frecuencia de animales infectados en estos dos focos, 42,8% en Mbini y 27,1% en Kogo, no se registraron síntomas de tripanosomiasis, ni en el momento de realizar la encuesta, ni varios meses después. Esto concuerda con anteriores hallazgos que demuestran que las infecciones por *T. congolense* y/o *T. brucei* s.l. son a menudo asintomáticas ([Ilemobade y Balogun, 1981](#)).

En este estudio no se llevó a cabo el diagnóstico específico de *T. b. gambiense* tipo I, por lo que no podemos determinar el papel que estos animales pueden jugar como reservorios del tripanosoma humano. En estudios llevados a cabo en Camerún se ha aislado ADN de *T. b. gambiense* tipo I en mamíferos no humanos, salvajes ([Herder y col., 2002](#); [Njiokou y col., 2006](#)) y domésticos ([Asonganyi y col., 1990](#); [Simo y col., 2006](#)). Esto es factible si tenemos en cuenta que el principal vector en la zona, *G. p. palpalis* puede alimentarse de sangre humana y animal ([Laveissière y col., 1985](#); [Njiokou y col., 2004](#)). Sin embargo, cabe pensar que dichas infecciones pudieran ser

accidentales y transitorias. En este sentido, un estudio llevado a cabo en Camerún demostró la reducción en la prevalencia de infección por *T. b. gambiense* tipo I en animales tras la puesta en marcha de actividades de control vectorial y detección activa de casos ([Njioku y col., 2006](#)), lo cual nos debe hacer pensar en la importancia que pueden tener ciertas especies animales en el mantenimiento de la transmisión en focos de África Central.

En Kogo y Mbini se ha observado un claro estancamiento en el diagnóstico de casos de THA desde el año 2000, a pesar de las continuas campañas de detección activa emprendidas por el programa nacional de control en los últimos 20 años (datos no publicados, PNCTHA). Una posible explicación a este estancamiento podría ser el mantenimiento de la infección en reservorios animales, hecho que todavía no ha podido ser demostrado en los focos endémicos de Guinea Ecuatorial. El diagnóstico parasitológico en animales no es concluyente puesto que no es posible diferenciar morfológicamente las tres subespecies de *T. brucei* s.l. (*T. b. brucei*, *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*). Y, como vimos en la introducción, el empleo de técnicas moleculares para el diagnóstico plantea ciertas limitaciones que afectan a la recogida y conservación de la muestra, estandarización de los protocolos de extracción de ADN, y reproducibilidad de las técnicas de amplificación de ADN especie-específico ([Kyambadde y col., 2000](#); [Solano y col., 2002](#)).

Por otra parte, se observó una clara asociación entre la DA de mosca y el riesgo de infección en ganado doméstico. Durante el estudio, el promedio de la densidad aparente de mosca tsetsé fue más alta en Mbini que en Kogo, y la distancia de las trampas -colocadas en zonas consideradas a priori de elevado riesgo de transmisión- a las localidades de estudio, fue significativamente menor en Mbini. Esto podría explicar las diferencias encontradas en la frecuencia de infección entre los dos focos. Por tanto, debemos pensar en la importancia de la transmisión peridoméstica en Mbini, ya observada en otros focos endémicos ([Eouzan y Ferrara, 1978](#); [Laveissière y col., 1986](#)), mientras que en Kogo el mayor riesgo de infección se encontraría en las localidades próximas a los cauces fluviales del estuario, lejos de los principales núcleos de población.

Sin embargo, debemos considerar estos resultados con cautela ya que no se han tenido en cuenta otros factores determinantes en la transmisión de la tripanosomiasis, como son las preferencias alimenticias de las especies vectoras ([Njokou y col., 2004](#)) y las fluctuaciones estacionales de la densidad asociadas, principalmente, a la

pluviometría ([Nash, 1937](#)). Por otra parte, aunque se sabe que otros insectos hematófagos (Diptera: Tabanidae) pueden ser transmisores de algunas especies de tripanosoma, como *T. vivax* y *T. congolense* ([Desquesnes y Dia, 2003](#); [Desquesnes y Dia, 2004](#)), la alta frecuencia de infecciones en los animales encuestados por *T. brucei* s.l. reforzaría la asociación entre la densidad aparente de mosca tsetsé y la infección por tripanosoma en ganado peridoméstico de Kogo y Mbini.

VI. CONCLUSIONES

- 1.1. La densidad de las poblaciones de *G. p. palpalis* varía de forma significativa según el ecosistema.**

En Mbini, se ha observado que la densidad de las poblaciones de *G. p. palpalis* varía de un ecosistema a otro, siendo especialmente alta en las orillas del principal cauce fluvial, el río Wele. En el foco de Kogo, la predominancia del manglar en la zona hace menos patente esa variabilidad espacial asociada al hábitat. Las variaciones observadas en la distribución de las poblaciones de mosca tsetsé en Kogo probablemente, están más influenciadas por otro tipo de variables, como la disponibilidad de huéspedes potenciales o factores climatológicos.

- 1.2. *G. p. palpalis*, principal vector de la tripanosomiasis en África Central, puede mostrar hábitos peridomésticos, pudiendo darse la transmisión de la infección dentro de los poblados.**

En el foco de Mbini, *G. p. palpalis* está presente en puntos de agua (pozos, pequeños afluentes, lagunas) circundantes a los núcleos de población, posibilitando la transmisión peridoméstica de la tripanosomiasis. La alta frecuencia de infección por *Trypanosoma* sp en ganado doméstico de las localidades de Mbini, significativamente superior a la observada en Kogo, vendría a reforzar la teoría de la transmisión peridoméstica.

- 1.3. La poblaciones de *G. p. palpalis* tienden a dispersarse durante el periodo de lluvias siguiendo los cauces fluviales. Este comportamiento puede permitir la recolonización desde zonas no controladas.**

En el foco de Kogo, este fenómeno de dispersión explicaría las diferencias observadas entre estación seca y lluviosa en la densidad aparente de *G. p. palpalis*. Los modelos espaciales generados para la densidad aparente de *G. p. palpalis* en Kogo, muestran cómo las poblaciones vectoras tienden a concentrarse durante la estación seca en la zona conocida como epicentro del foco (zonas de mayor transmisión), mientras que en el periodo de lluvias se

observa una mayor homogeneidad en la distribución de las poblaciones de *G. p. palpalis* en todo el foco.

En Mbini, no se observaron diferencias espaciales y temporales significativas en la densidad aparente de *G. p. palpalis*. La baja densidad y la homogeneidad en la distribución espacial de las poblaciones de mosca tsetse, probablemente sean atribuibles al impacto de la actividad de control mediante el empleo de trampas piramidales desde el año 2002.

1.4. La localización de las zonas de mayor riesgo de transmisión permite una mejor gestión de las actividades de control vectorial y optimización de recursos.

La aplicación de técnicas de análisis espacial y el desarrollo de un sistema de información geográfica han permitido estudiar la distribución y dinámica de las poblaciones de *G. p. palpalis* en los focos de Kogo y Mbini, y han demostrado ser herramientas útiles para discriminar zonas de alto riesgo de transmisión de la tripanosomiasis.

2.1. Las trampas piramidales reducen la densidad de las poblaciones de mosca tsetse ribereñas y, por tanto, son una buena herramienta de control vectorial.

En los focos de Mbini y Kogo las trampas piramidales han mostrado ser una herramienta útil para el control de *G. p. palpalis*, aunque en Mbini es necesario intensificar la actividad en las orillas del río Wele, incluyendo las zonas no pobladas. De esta forma, reduciremos el riesgo de infección para la población que permanece de manera temporal en la zona y evitaremos las recolonizaciones de las áreas controladas.

Puesto que el foco de Kogo se extiende desde el sur de Guinea Ecuatorial al norte de Gabón, es necesario planificar intervenciones a una escala mayor implicando a estos dos países, con el fin de garantizar el éxito del control a medio-largo plazo. Estas intervenciones deberían fundamentarse en la intensificación de la detección y tratamiento de casos en toda el área, y el empleo de trampas piramidales de forma selectiva en los puntos de menor transmisión y extensiva en las zonas de mayor riesgo de transmisión. La puesta en marcha de otras estrategias de control

vectorial para reforzar las intervenciones con trampas, como la introducción de machos estériles, requiere de estudios más exhaustivos sobre la capacidad de dispersión de las poblaciones de *G. p. palpalis* en la zona.

3.1. La frecuencia de infección por tripanosomas en ganado peridoméstico, al comienzo de la puesta en marcha de una campaña de control vectorial con trampas, es alta en los focos de Kogo y Mbini.

La infección por *Trypanosoma* sp en ganado peridoméstico es alta en los focos continentales de Guinea Ecuatorial, especialmente en Mbini. Es necesario llevar a cabo nuevos estudios para determinar el impacto de los cinco años de control vectorial sobre la transmisión de la tripanosomiasis en ganado peridoméstico de estos dos focos.

3.2. Al igual que en otros países de la subregión, las infecciones por *T. brucei* s.l. en mamíferos no humanos son menos prevalentes que las infecciones por otras especies como *T. vivax* o *T. congolense*.

Al contrario de lo observado en países vecinos, como Camerún, las infecciones por *T. brucei* s.l. en mamíferos no humanos son más prevalentes que las infecciones por otras especies como *T. vivax* o *T. congolense*. Este resultado aportaría información indirecta de la baja contribución de la transmisión mecánica (posible para *T. vivax* y *T. congolense*), ya sea por la mosca tsetsé u otras moscas hematófagas, en la transmisión de la tripanosomiasis animal en los dos focos.

La prevalencia alta de infecciones por *T. brucei* s.l. y el estancamiento en el diagnóstico de casos de THA en los últimos años nos debe hacer pensar en el posible papel de estos animales como potenciales reservorios de la infección humana. Es necesario confirmar la presencia de *T. b. gambiense* en animales domésticos y salvajes, y determinar la persistencia de dichas infecciones, para clarificar el papel que ciertas especies animales pueden jugar en el mantenimiento de estos focos históricos.

3.3. Existe diferencia significativa en la frecuencia de infección por *T.*

***brucei* s.l. entre especies animales.**

En los dos focos se observó un mayor riesgo de infección en las cabras, aunque la infección en cerdos también resultó alta. Esta diferencia podría estar asociada con las preferencias alimenticias de las glosinas vectoras, o con los hábitos de vida de las diferentes especies animales.

4.1. La prevalencia de infección por *Trypanosoma* sp varía notablemente entre los focos, y está relacionado con la densidad aparente de mosca tsetsé.

Se observó una clara asociación positiva entre la densidad aparente de mosca tsetsé y el riesgo de infección en ganado doméstico. El promedio de la densidad aparente de mosca tsetsé fue más alta en Mbini que en Kogo al comienzo de las actividades de control vectorial (año 2002), y la distancia de las trampas - colocadas en zonas consideradas *a priori* de elevado riesgo de transmisión- a las localidades de estudio fue significativamente menor en Mbini. Esto podría explicar las diferencias encontradas en la frecuencia de infección entre los dos focos, más alta en Mbini que en Kogo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abel, P.M., Kiala, G., Lôa, V., Behrend, M., Musolf, J., Fleischmann, H., Théophile, J., Krishna, S. y Stich, A.** (2004). Retaking sleeping sickness control in Angola. *Trop. Med. Int. Health* **9(1)**: 141-148.
2. **Alvar, J., Mas-Coma, S. y Carrasco, M.** (1996). Modern history and physical geography of Equatorial Guinea. *Res. Rev. Parasitol.* **56(2-3)**: 77-83.
3. **Allsopp, R.** (1998). GIS and remote sensing aida tsetse control in Botswana. *Pestic. Outlook* **9**: 9-12.
4. **Allsopp, R.** (2001). Options for vector control against tripanosomiasis in Africa. *Trends. Parasitol.* **17**:15-19.
5. **Allsopp, R. y Philemon-Motsu, T.K.** (2002). Tsetse control in Botswana – a reversal in strategy. *Pestic. Outlook* **13**: 73-76.
6. **Asonganyi, T., Sede, M.J. y Ngu, J.L.** (1986). Trypanosomiasis in Mbam division, Cameroon: parasitological and immunodiagnosis examination of the domestic animal population. *Ann. Univ. Sci. Santé* **3**: 181-189.
7. **Awa, D.N. y Ndamkou, C.N.** (2006). Response of *Trypanosoma vivax* and *Trypanosoma congolense* in zebu cattle in North Cameroon to prophylatic treatment with two formulations of isometamidium. *Prev. Vet. Med.* **76**: 90-96.
8. **Barret, P.M., Burchmore, R.J., Stich, A., Lazzari, J.O., Frasc, A.C., Cazzulo, J.J. y Krishna, S.** (2003). The trypanosomiasis. *Lancet* **362**: 1469-1480.
9. **Beier, J.C., Killeen, G.F. y Githure, J.I.** (1999). Entomologic inoculation rates and *Plasmodium falciparum* malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **61**: 109-113.
10. **Boid, R., el-Amin, E.A., Mahmoud, M.M. y Luckins, A.G.** (1981). *Trypanosoma evansi* infections and antibodies in gotas, sheep and camels in the

Sudan. *Trop. Anim. Health Prod.* **13**: 141-146.

11. **Bromidge, T., Gibson, W., Hudson, K. y Dukes, P.** (1993). Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop.* **61**: 107-119.
12. **Brun, R., Hecker, H. y Lun, Z.R.** (1998). *Trypanosoma evansi* and *T. equiperdum*: distribution, biology, treatment and phylogenetic relationship (a review). *Vet. Parasitol.* **79**: 95-107.
13. **Brunhes, J., Cuisance, D., Geoffroy, B., Hervy, J.P. y Lebbe, J.** (1998). *Les glossines ou mouches tsé-tsé. Logiciel d'identification. Glossine Expert.* Manuel illustré d'utilisation, Cirard, Université Paris – VI, ORSTOM, Paris.
14. **Bryan, R., Waskin, J. y Richards, F.** (1989). African trypanosomiasis in American travellers: a 20-year review. Pp 384-8. International Travel Medicine. Eds Berlin: Springer-Verlag.
15. **Cattand, P., Jannin, J. y Lucas, P.** (2001). Sleeping sickness surveillance: and essential step towards elimination. *Trop. Med. Int. Health* **6**: 348-361.
16. **Chauvet, G., Lemasson, J. y Wibaux-Charlois, M.** (1980). Opération expérimentale de lutte contre Glossinas palpalis palpalis dans le foyer de Bafia. *XIII Conf. Tech. OCEAC* Yaoundé, Cameroun.
17. **Courtin, F., Jamonneau, V., Oké, E., Coulibaly, B., Oswald, Y., Dupont, S., Cuny, G., Doumenge, J.P. y Solano, P.** (2005a). Towards understanding the presence/absence of Human African Trypanosomiasis in a focus of Côte d'Ivoire: a spatial analysis of the pathogenic system. *Int. J. Health. Geogr.* **4**: 27-36.
18. **Courtin, F., Dupont, S., Zeze, D.G., Jamonneau, V., Sané, B., Coulibaly, B., Cuny, G. y Solano, P.** (2005b). Trypanosome Humaine Africaine: transmission urbaine dans le foyer de Bonon (Côte d'Ivoire). *Trop. Med. Int. Health* **4**: 340-346.

19. **Cressie, N.** (1991). *Statistics for spatial data*. Ed. Wiley, New York.
20. **Da Costa, B.F.P.** (1916). *Sleeping sickness, a record of four years war against it in Principe, Portuguese West Africa*. London, Ballière, Tindall and Cox.
21. **De Deken, R., Sumbu, J., Mpiana, S., Mansinsa, P., Wat'senga, F., Lutumba, P., Boelaert, M. y Van Den, P.** (2005). Trypanosomiasis in Kinshasa: distribution of the vector, *Glossina fuscipes quanzensis*, and risk of transmission in the peri-urban area. *Med.Vet. Entomol.* **19**: 353-359.
22. **Dennis, D.T., Nekomoto, T.S., Victor, J.C., Paul, W.S. y Piesman, J.** (1998). Reported distribution of *Ixodes scapularis* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *J. Med. Entomol.* **35**: 629-638.
23. **Desquesnes, M. y Dia, M.L.** (2003). Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Exp. Parasitol.* **105(3-4)**: 226-231.
24. **Desquesnes, M. y Dia, M.L.** (2004). Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet. Parasitol.* **119(1)**: 9-19.
25. **Ebeja, A.K., Lutumba, P., Molisho, D., Kegels, G., Belenge, C.M. y Boelaert, M.** (2003). La maladie du sommeil dans la région de Kinshasa : une analyse rétrospective des données de surveillance sur la période 1996-2000. *Trop. Med. Int. Health* **8**: 949-955.
26. **Enanga, B., Burchmore, R.J., Stewart, M.L. y Barrett, M.P.** (2002). Sleeping sickness and the brain. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 845-858.
27. **Eouzan, J.P. y 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.

28. **Gatton, M., Kelly-Hope, L., Kay, B. y Ryan, P.** (2004). Spatial-temporal analysis of Ross River virus disease patterns in Queensland, Australia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 629-635.
29. **Geerts, S. y Holmes, P.H.** (1998). Drug management and parasite resistance in bovine trypanosomiasis in Africa. PAAT Technical and Scientific Series No. 1, FAO.
30. **Geerts, S., Holmes, P. H., Dial, O. y Eisler, M. C.** (2001). African bovine trypanosomiasis: the problem of drug resistance. *Trends Parasitol.* **17**: 25-28.
31. **Gibson, W.** (2002). Will the real *Trypanosoma brucei rhodesiense* please step forward?. *Trends Parasitol.* **18**: 486-490.
32. **González-Vicente, D., Herrero, A. y Moliner, R.** (1968). Importancia de las grandes enfermedades transmisibles en la sanidad pública de Guinea Ecuatorial y su relación en las grandes campañas de masas. *Med. Trop.* **4**, 282-293.
33. **Goossens, B., Osaer, S., Ndao, M., Van Winghem, J. y Geerts, S.** (1999). The susceptibility of Djallonke and Djallonke-Sahelian crossbred sheep to *Trypanosoma congolense* and helminth infection under different diet levels. *Vet. Parasitol.* **85**: 25-41.
34. **Gouteux, J.P. y Lancien, J.** (1986a). Le piège pyramidal à tsetse (Diptera: Glossinidae) pour la capture et la lutte: Essais comparatifs et description de nouveaux systèmes de capture. *Trop. Med. Parasitol.* **37**: 61-66.
35. **Gouteux, J.P. y Lancien, J.** (1986b). Control of vectors by trapping and its impact on sleeping sickness in a zone of high density of *Glossina fuscipes quanzensis* (Lefini River, Republic of the Congo). *Trop. Med. Parasitol.* **37**:101-104.
36. **Hager, K.M. y Hajduk, S.L.** (1997). Mechanisms of resistance of African trypanosomes to cytolytic high density lipoprotein. *Nature* **385**: 823-826.

37. **Hargrove, J.W.** (1991). Ovarian ages of tsetse flies (Diptera: Glossinidae) caught from mobile and stationary baits in the presence and absence of humans. *Bull. Entomol. Res.* **81**: 43–50.
38. **Hargrove, J.W. y Borland, C.H.** (1994). Pooled population parameter estimates from mark–release–recapture data. *Biometrics* **50**: 1129–1141.
39. **Hay, S.I., Snow, R.W. y Rogers, D.J.** (1998). From predicting mosquito habitat to malaria seasons using remotely sensed data: practice, problems and perspectives. *Parasitol. Today* **14**: 306-313.
40. **Herder, S., Simo, G., Nkinin, S. y Njiokou, F.** (2002). Identification of trypanosomes in wild animals from Southern Cameroon using the polymerase chain reaction (PCR). *Parasite* **9**: 345-349.
41. **Hide, G., Cattand, P., LeRay, D., Barry, J.D. y Tait, A.** (1990). The identification of *Trypanosoma brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 213-225.
42. **Hoare, C.A.** (1972). The trypanosomes of mammals. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, p. 749.
43. **Horchner, F., Zillmann, U., Metzner, M., Schonefeld, A. y Mehlitz, D.** (1985). West African dogs as a model for research on trypanotolerance. *Trop. Med. Parasitol.* **36**: 257-258.
44. **Ilemobade, A.A. y Balogun T.F** (1981). Pig trypanosomiasis: effects of infection on feed intake, liveweight gain and carcass traits. *Trop. Anim. Health. Prod.* **13**: 128-36.
45. **Jackson, C.N.** (1946). An artificially isolated generation of tsetse flies (Diptera). *Bull. Entomol. Res.* **37**: 291.
46. **Jackson, C.N.** (1953). A mixed population of *Glossina morsitans* and *G. swynnertoni*. *J. Animal Ecol.* **22**, 78–86.

47. **Jamonneau, V., Ravel, S., Koffi, M., Kaba, D., Zeze, D.G., Ndri, L., Sane, B., Coulibaly, B., Cuny, G. y Solano, P.** (2004). Mixed infections of trypanosomes in tsetse and pigs and their epidemiological significance in a sleeping sickness focus of Côte d'Ivoire. *Parasitology* **129**: 693-702.
48. **Jenni, L. y Brun, R.** (1982). A new *in vitro* test for human serum resistance of *Trypanosoma (T.) brucei*. *Acta Trop.* **39**: 281-284.
49. **Joshi, P.P., Sheg, V.R., Powar, R.M., Herder, S., Katti, R., Salkar, H.R., Dani, V.S., Bhargava, A., Jannin, J. Y Truc, P.** (2005). Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**: 491-495.
50. **Joshua, R.A.** (1998). Infectivity and virulence in a serodeme of *Trypanosoma vivax*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **11**: 99-104.
51. **Joubert, J.J., Schutte, CH., Irons. D.J. y Fripp. P.J.** (1993). Ubombo and the site of David Bruce's discovery of *Trypanosoma brucei*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **87**: 494-495.
52. **Kanmogne, G.D., Stevens, J.R., Asonganyi, T. y Gibson, W.C.** (1996). Characterization of *Trypanosoma brucei gambiense* isolates using restriction fragment length polymorphisms in 5 variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop.* **61**: 239-254.
53. **Kappmeier, K., Nevill, E.M. y Bagnall, R.J.** (1998). Review of tsetse flies and trypanosomosis in South Africa. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* **65**: 195-203.
54. **Kemp, S.J. y Teale, A.J.** (1998). Genetic basis of trypanotolerance in cattle and mice. *Parasitol. Today.* **14**: 450-454.
55. **Kitron, U., Otieno, L.H., Hungeford, L.L., Odulaja, A., Brigham, W.U., Okello, O.O., Joselyn, M., MohamedAhmed, M.M. y Cook, E.** (1996). Spatial analysis of the distribution of tsetse flies in the Lambwe Valley, Kenya,

- using Landsat TM imagery and GIS. *J. Anim. Ecol.* **65**: 371-380.
56. **Kitron, U.** (1998). Landscape ecology and epidemiology of vector-borne diseases: tools for spatial analysis. *J. Med. Entomol.* **35**: 435-445.
57. **Kitron, U.** (2000). Risk maps: transmission and burden of vector-borne diseases. *Parasitol. Today* **16**: 324-325.
58. **Krebs, C.J.** (1989). Ecological Methodology. Ed. Harper & Row Publishers, New York.
59. **Kuzoe, F.A.S. y 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.
60. **Kyambadde, J.W., Enyaru, J.C.K., Matovu, E., Odiit, M. y Carasco, J.F.** (2000). Detection of trypanosomes in suspected sleeping sickness patients in Uganda using the polymerase chain reaction. *Bull. W.H.O.* **78**: 119-124.
61. **Lancien, J.** (1981). Description du piège monoconique utilisé pour l'élimination des glossines en République Populaire du Congo. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Med. Parasitol.* **4**:235-238.
62. **Lancien, J.** (1991). Lutte contre la maladie du sommeil dans le sud-est Ouganda par piégeage des *Glossines*. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **71**:35-47.
63. **Laveissière, C. y Couret, D.** (1981). Lutte contre les glossines riveraines à l'aide de pièges biconiques imprégnés d'insecticide, en zone de savane humide. Expérimentation à grande échelle. *Cah ORSTOM, Sér. Ent. Med. Parasitol.* **1**:41-48.
64. **Laveissière, C., Couret, D., Staak, C. y Hervouet, J.P.** (1985). *Glossina palpalis* et ses hôtes en secteur forestier de Côte d'Ivoire. Relation avec l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine. *Cah ORSTOM, Sér. Ent. Méd. Parasitol.* **23**: 297-303.

-
65. **Laveissière, C., Couret, D. y Hervouët, J.P.** (1986). Localisation et fréquence du contact homme/glossine en secteur forestier de Côte d'Ivoire, Recherche des points épidémiologiquement dangereux dans l'environnement végétal. *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. Parasitol.* **24**: 21-35.
66. **Laveissière, C. y Grébaud, P.** (1990). Recherches sur les pièges à glossines: mise au point d'un modèle économique: le piège « Vavoua ». *Trop. Med. Parasitol.* **41**:185-192.
67. **Laveissière, C. y Penchenier, L.** (2000). Manuel de lutte contre la Maladie du Sommeil en Afrique centrale & occidentale. Vol. 5. *Lutte Antivectorielle*. Ed. OCEAC (IRD), Yaoundé, Cameroun.
68. **Leak, S.G.A.** (1998). Tsetse Biology and Ecology: their role in the epidemiology and control of trypanosomosis. Ed. CABI Publishing –in association with the International Livestock Research Institute.
69. **Leeflang, P., Buys, J. y Blotkamp, C.** (1976). Studies on *Trypanosoma vivax*: infectivity and serial maintenance of natural bovine isolates in mice. *Int. J. Parasitol.* **6**: 413-417.
70. **Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R. 3rd, Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. y Wallace, F.G.** (1980). A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* **27**: 37-58.
71. **Louis, F.J., Simarro, P.P. y Lucas, P.** (2002). Sleeping sickness: one hundred years of control strategy evolution. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **95(5)**: 331-336.
72. **Liebhold, A.M., Rossi, R.E. y Kemp, W.P.** (1993). Geostatistics and geographic information systems in applied insect ecology. *Ann. Rev. Entomol.* **38**: 303-327.
73. **Majiwa, P.A.O.** (1998). Application of the polymerase chain reaction for

- detection of trypanosomes. En: Towards Livestock Disease Diagnosis and Control in the 21st Century. Proceedings fo an International Symposium on Diagnosis and Control of Livestock Diseases Using Nuclear and Related Techniques. International Atomic Energy Agency, Vienna, 7-11 April 1997.
74. **Makumyaviri, A., Mehlitz, D., Kageruka, P., Kazyumba, G.L. y Molisho, D.** (1989). Animal reservoir hosts of *Trypanosoma brucei gambiense* in Zaire: trypanosome infections in two foci in Bas-Zaire. *Trop. Med. Parasitol.* **40**: 258-262.
75. **Malavasi, A., Sheesly, D. y Schofield, C.J.** (2004). Evaluation report of Agency Tsetse Fly eradication activities. *IAEA Report to the Office of Internal Oversight Services*, Vienna.
76. **Malele, I., Lehane, M. y Gibson, W.C.** (2003). The use of specific and generic primers to identify trypanosomes infections of wild tsetse flies in Tanzania by PCR. *Infect. Genet. Evol.* **3**: 271-279.
77. **Masake, R.A., Majiwa, P.A.O., Mooloo, S.K., Makau, J.M. Njuguna, J.T., Maina, M., Kabata, J., Ole-MoiYoi, O.K. y Nantulya V.M.** (1997). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Exp. Parasitol.* **85**: 193-205.
78. **Masiga, D.K., Smyth, A.J., Hayes, P., Bromidge, T.J. y Gibson, W.C.** (1992). Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by DNA amplification. *Int. J. Parasitol.* **22**: 909-918.
79. **Mehlitz, D.** (1979). Trypanosome infections in domestic animals in Liberia. *Tropenmed. Parasitol.* **30**: 212-219.
80. **Mehlitz, D., Brinkmann, U. y Haller, L.** (1981). Epidemiological studies on the animal reservoir of gambiense sleeping sickness. Part I. Review of literature and description of the study areas. *Tropenmed. Parasitol.* **32(3)**: 129-133.
81. **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, France.

82. **Molyneux, D.** (2001). Sterile insect release and trypanosomiasis control: a plea for realism. *Trends Parasitol.* **17**: 413-414.
83. **Moore, D.A., Edwards, M., Escombe, R., Agranoff, D., Bailey, J.W., Squire, S.B. y Chiodini, P.L.** (2002). African trypanosomiasis in travelers returning to the United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 74-76.
84. **Morlais, I., Ravel, S., Grebaut, P., Dumas, V. y Cuny, G.** (2001). New molecular marker for *Trypanosoma (Duttonella) vivax* identification. *Acta Trop.* **80**: 207-213.
85. **Morris, K.R.S.** (1951). The ecology of location of epidemic sleeping sickness. Part I. Significance of location. *Bull. Entomol. Res.* **42**: 427.
86. **Moser, D.R., Cook, G.A., Ochs, D.E., Baily, C.P., McKana, M.R. y Donelson, J.E.** (1989). Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Parasitology* **99**: 57-66.
87. **Murray, M., Stear, M.J., Trail, J.C.M., d'Ieteren, G.D.M., Agyemang, K. y Dwinger, R.H.** (1991). Trypanosomiasis in cattle: prospects for control. En: Breeding for Disease Resistance in Farm Animals. Owen, J.B., Axford, R.F.E. (Eds.) CAB International, Wallingford, pp. 203-223.
88. **Naessens, J.** (2006). Bovine trypanotolerance: A natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome? *Int. J. Parasitol.* **36**: 521-8.
89. **Nansen, C., Campbell, J.F., Phillips, T.W. y Mullen, M.A.** (2003). The impact of spatial structure on the accuracy of contour maps of small data sets. *J. Econ. Entomol.* **96**: 1617-1625.
90. **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.
91. **Nash, T.A.M.** (1937). Climate: the vital factor in the ecology of *Glossina*. *Bull. Entomol. Res.* **28**: 75–131.
92. **Nash, T.A.M. y Page, W.A.** (1953). On the ecology of *Glossina palpalis* in northern Nigeria. *Trans. R. Entomol. Soc. London* **104**: 71–170.
93. **Ng'ayo, M.O., Njiru, Z.K., Kenya, E.U., Muluvi, G.M., Osir, E.O. y Masiga, D.K.** (2005). Detection of trypanosomes in small ruminants and pigs in western Kenya: important reservoirs in the epidemiology of sleeping sickness?. *Kineto. Biol. Dis.* **45**: 1-7.
94. **Njiokou, F., Simo, G., Mbida Mbida, A., Truc, P., Cuny, G. y Herder, S.** (2004). A study of host preference in tsetse flies using a heteroduplex PCR method. *Acta Trop.* **91**: 117-120.
95. **Njiokou, F., Laveissière, C., Simo, G., Nkinin, S., Grébaut, P., Cuny, G. y Herder, S.** (2006). Wild fauna as probable animal reservoir for *Trypanosoma brucei gambiense* in Cameroon. *Infect. Genet. Evol.* **6**: 147-153.
96. **Nkinin, S.W., Njiokou, F., Penchenier, L., Grébaut, P., Simo, G. y Herder, S.** (2002). Characterization of *Trypanosoma brucei* s.l. subspecies by isoenzymes in domestic pigs from Fontem sleeping sickness focus of Cameroon. *Acta Trop.* **81**: 225-232.
97. **Odiit, M., Bessell, P.R., Fèvre, E.M., Robinson, T., Kinoti, J., Coleman, P.G., Welburn, S.C., McDermott, J. y Woolhouse, M.E.J.** (2006). Using remote sensing and geographic information systems to identify villages at high risk for *rhodesiense* sleeping sickness in Uganda. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**: 354-362.
98. **O.M.S.** (1986). Epidemiology and Control of Human African Trypanosomiasis. Report of a WHO expert committee on sleeping sickness. World Health Organization Technical Report Series **739**.

-
99. **O.M.S.** (1998). WHO Report on Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis. World Health Organization, Geneva.
 100. **O.M.S.** (2001a). Acción contra las infecciones. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud*, **2**: 1-4.
 101. **O.M.S.** (2001b). WHO's Human African Trypanosomiasis Treatment and Drug Resistance Network. <http://www.who.int/emc/diseases/trypanodot.html>
 102. **O.M.S.** (2001c). African trypanosomiasis. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases, World Health Organization, Geneva.
 103. **O.M.S.** (2006). Weekly epidemiological record. World Health Organization, Geneva **81**: 71-79.
 104. **Penchenier, L., Simarro, P. y Ndong-Asumu, P.** (1996). Historique et evolution de la maladie du sommeil en Guinee Equatoriale. *Bull. liais. doc. OCEAC* **29(3)**: 69-74.
 105. **Pentreath, V.W.** (1995). Trypanosomiasis and the nervous system: pathology and immunology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **89**: 9-15.
 106. **Picozzi, K., Carrington, M. y Welburn, S.C.** (2007). A multiplex PCR that discriminates between *Trypanosoma brucei brucei* and zoonotic *T. b. rhodesiense*. *Exp. Parasitol.* (in press).
 107. **Pittaluga, G.** (1910). Informe de la comisión del Instituto Nacional de Higiene de Alfonso XIII para el estudio de la enfermedad del sueño. *Madrid J. Blassy y cia*.
 108. **Ponce-de-Leon, S., Lisker-Melman, M., Kato-Maeda, M., Gamboa-Dominguez, A., Ontiveros, C., Behrens, R.H. y Gonzalez-Ruiz, A.**(1996). *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection imported to Mexico from a tourist resort in Kenya. *Clin. Infect. Dis.* **23**: 847-848.

109. **Radwanska, M., Claes, F., Magez, S., Magnus, E., Perez-Morga, D., Pays, E. y Buscher, P.** (2002). Novel primer sequences for polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67(3)**: 289-295.
110. **Rasooly, R. y Balaban, N.** (2004). Trypanosome microtubule-associated protein p15 as a vaccine for the prevention of African sleeping sickness. *Vaccine* **22**: 1007-1015.
111. **Reifenberg, J.M., Solano, P., Duvallet, G., Cuisance, D., Simpoire, J. y Cuny, G.** (1997). Molecular characterization of trypanosome isolates from naturally infected domestic animals in Burkina Fasso. *Vet. Parasitol.* **71**: 251-262.
112. **Ripamonti, D., Massari, M., Arici, C., Gabbi, E., Farina, C., Brini, M., Capatti, C. y Suter, F.** (2002). African sleeping sickness in tourists returning from Tanzania: the first 2 Italian cases from a small outbreak among European travelers. *Clin. Infect. Dis.* **34**: 18-22.
113. **Robays, J., Ebeja Kadima, A., Lutumba, P., Miaka mia Bilenge, C., Kande Betu Ku Mesu, V., De Deken, R., Makabuza, J., Deguerry, M., Van der Stuyft, P. y Boelaert, M.** (2004). Human African trypanosomiasis amongst urban residents in Kinshasa: a case-control study. *Trop. Med. Int. Health* **9**: 869-875.
114. **Robinson, T.P.** (1998). Geographic Information Systems and the selection of priority areas for control of tsetse-transmitted trypanosomiasis in Africa. *Parasitol. Today* **14**: 457-461.
115. **Rogers, D.J.** (1985). Trypanosomiasis "risk" or "challenge": a review. *Act. Trop.* **42**: 5-23.
116. **Rogers, D.J. y Randolph, S.E.** (1991). Mortality rates and population density of tsetse flies correlated with satellite imagery. *Nature* **351**: 739-741.

-
117. **Ryan, L., Molyneux, D.H., Kuzoe, F.A.S. y Baldry, D.A.T.** (1981). Traps to control and estimate populations of *Glossina* species. *Tropenmed. Parasitol.* **32**: 145-148.
118. **Ryan, P., Lyons, S.A., Alsemgeest, D., Thomas, P. y Kay, B.H.** (2004). Spatial statistical analysis of adult mosquito (Diptera: Culicidae) counts: an example using light trap data, in Redland Shire, southeastern Queensland, Australia. *J. Med. Entomol.* **41**: 1143-1156.
119. **Sanchez-Moreno, M., Fernandez-Becerra, C., Fernandez-Ramos, C., Luque, F., Rodriguez-Cabezas, M.N., Dollet, M. y Osuna, A.** (1998). Trypanosomatid protozoa in plants of southeastern Spain: characterization by analysis of isoenzymes, kinetoplast DNA, and metabolic behavior. *Parasitol. Res.* **84**: 354-361.
120. **Simarro, P.P., Sima, F.O. y Vilalta, M.M.** (1988). Epidemiology of sleeping sickness in Equatorial Guinea. *OAU/STRC* **13(6053)**: 196-204.
121. **Simarro, P.P., Mas, J., Lancien, J., Ona-Sima, F., Mateo, M.J. y Roche, J.** (1990). Epidemiology of human trypanosomiasis in the Luba focus, in Equatorial Guinea. *Rev. Sanid. Hig. Publica* **64**: 517-534.
122. **Simarro, P.P., Sima, F.O., Mateo, M.J. y Roche, J.** (1991a). Evaluation of three approaches for the control of African Human Trypanosomiasis in the Luba focus in Equatorial Guinea. *OAU/STRC* **15(7082)**: 115-116.
123. **Simarro, P.P., Sima, F.O., Mateo, M.J. y Roche, J.** (1991b). La lutte contre la trypanosomiase humaine africaine dans le foyer de Luba en Guinée Équatoriale: bilan de trois méthodes. [Control of Human African Trypanosomiasis in the focus of Luba in Equatorial Guinea : review of three methods]. *Bull WHO* **69**: 451-457.
124. **Simarro, P.P., Franco, J.R. y Asumu, P.N.** (2001). Has the focus of human African trypanosomiasis in Luba, Equatorial Guinea been eradicated? *Med. Trop.* **61(4-5)**: 441-444.

125. **Simarro, P.P., Franco, J.R., Ndongo, P., Nguema, E., Louis, F.J. y Jannin, J.** (2006). The elimination of *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness in the focus of Luba, Bioko Island, Equatorial Guinea. *Trop. Med. Int. Health* **5**: 636-646.
126. **Simarro, P.P., Jannin, J. Y Cattand, P.** (2008). Eliminating Human African Trypanosomiasis: where do we stand and what comes next?. *PLoS Medicine* **5**: 174-180.
127. **Simo, G., Asonganyi, T., Nkinin, S.W., Njiokou, F. y 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.
128. **Sinha, A., Grace, C., Alston, W.K., Westenfeld, F. y Maguire, J.H.** (1999). African trypanosomiasis in two travelers from the United States. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 840-844.
129. **Solano, P., Jamonneau, V., N'Guessan, P., N`Dri, L., Dje, N.N., Miezán, T.W., Lejon, V., Büscher, P. y Garcia, A.** (2002). Comparison of different DNA preparation protocols for PCR diagnosis of Human Trypanosomiasis. *Acta Trop.* **82**: 349-356.
130. **Steverding, D.** (2008). The history of African trypanosomiasis. *Parasit. Vect.* **1**: 3. <http://www.parasitesandvectors.com/content/1/1/3>
131. **Swallow, B.M.** (2000). Impacts of trypanosomiasis on African agriculture. En: PAAT Technical and Scientific Series No. 2. PAAT Information Service Publication, FAO, Rome, p. 52.
132. **Takken, W., Oladunmade, M.A., Degwat, L., Feldmann, H.U., Onah, J.A., Tenabe, S.O. y Hamann H.J.** (1986). The eradication of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Glossinidae) using traps, insecticide-impregnated targets and the sterile insect technique in central Nigeria. *Bull. Entomol. Res.* **76**: 275-286.

-
133. **Uemura, A., Watarai, S., Ohnishi, Y. y Kodama, H.** (2005). Protective effect of antiganglioside antibodies against experimental *Trypanosoma brucei* infection in mice. *J. Parasitol.* **91**: 73-78.
134. **Vale, G.A.** (1969). Mobile attractants for tsetse flies. *Arnoldia*, **33**: 1-6.
135. **Vale, G.A., Flint, S. y Hall, D.R.** (1986). The field responses of tsetse flies, *Glossina* spp. (Diptera: Glossinidae), to odours of host residues. *Bull. Entomol. Res.* **76**: 685-693.
136. **Van den Bossche, P. y Chigoma, D.** (2001). Planning for the control of bovine trypanosomiasis in Southern Africa: A multidisciplinary approach. Livestock community and environment. En: Proceedings of the 10th Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine. Copenhagen, Denmark.
137. **Welburn, S.C., Picozzi, K., Fèvre, E.M., Coleman, P.G., Odiit, M., Carrington, M. y 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**: 2017-2019.
138. **Winrock International** (1992). Assessment of Animal Agriculture in Sub-Saharan Africa. Winrock International Institute for Agriculture Development Morrilton, USA, p. 125.
139. **Zippin, C.** (1956). An evaluation of the removal method of estimating animal populations. *Biometrics* **12**: 163-189.