

Caracterización de un anticuerpo monoclonal dirigido contra *Trypanosoma evansi* y su aplicación en la detección de antígenos circulantes

C.M. Monzón

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Formosa, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias de Formosa, C.C. n° 73 (P3600BCW), Formosa, Argentina

Remitido para publicación el 21 de marzo de 2005
Aceptado el 11 de noviembre de 2005

Resumen

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales dirigidos contra *Trypanosoma evansi*. El anticuerpo monoclonal 2-4F6 IgM fue seleccionado para realizar los estudios, por su capacidad para detectar antígenos y por su especificidad, pues no reconocía a *T. cruzi*, *T. equiperdum*, *Babesia equi* o *B. caballi*. El inmunoblot señaló que este anticuerpo monoclonal reconoce epítomos en dos bandas antigénicas, una de 85 kDa y otra de 122 kDa. Un inmunoensayo para la detección de antígenos en suero, que utilizaba como captura a anticuerpos policlonales, el anticuerpo monoclonal 2-4F6 como anticuerpo primario y secundariamente anticuerpos anti IgM de ratón, dio resultados positivos en 10 de 11 equinos infectados con el *T. evansi*, mientras que 20 controles dieron resultados negativos. Los resultados de este trabajo indican que el anticuerpo monoclonal 2-4F6 y el antígeno por él reconocido resultan útiles para identificar equinos infectados con *T. evansi*.

Palabras clave

Anticuerpo monoclonal – Antígeno circulante – Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato – Equino – Inmunoensayo – Surra – *Trypanosoma evansi* – Western Blot.

Introducción

El *Trypanosoma evansi*, agente causal de la surra, afecta a una gran variedad de animales domésticos y silvestres en grandes áreas del mundo con clima cálido (1, 2, 3, 4, 5, 12). En América del Sur y especialmente en el sub-trópico de Argentina la surra afecta principalmente a los equinos. La enfermedad en esa región es conocida como “mal de caderas” y ocasiona cada año la muerte de muchos animales (18, 20). El diagnóstico por medio de la detección de antígenos del *T. evansi* en la sangre de los

hospederos constituye un claro indicador de la infección (7, 24). Diversos métodos de laboratorio, basados principalmente en el empleo de anticuerpos monoclonales fueron evaluados con esa finalidad en camellos en África (7, 22), en búfalos en Asia (3, 4) y, en América del Sur, en equinos de Argentina (19). Sin embargo, debido a la falta de sensibilidad de los métodos y/o a las diferentes poblaciones de estos parásitos en el viejo y en el nuevo mundo, con estos reactivos muchos animales infectados no son detectados como tales (3, 4, 19). Por otra parte, la producción de estos reactivos con fines de diagnóstico es aún muy limitada en América del Sur.

El objetivo de este trabajo fue producir y evaluar nuevos anticuerpos monoclonales dirigidos contra *T. evansi* y examinar su potencial utilidad en pruebas de laboratorio para la detección de antígenos de este hemoparásito en equinos.

Materiales y métodos

Producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra *Trypanosoma evansi*

Inmunización de ratones

Se obtuvieron tripanosomas de la sangre de ratones CF1 inoculados con el aislamiento de campo de *T. evansi*/Payaguá provenientes de equinos infectados naturalmente en Formosa, Argentina (Fig. 1 y 2). Estos flagelados se purificaron por cromatografía de intercambio iónico, empleándose dietilaminoetil (DEAE) celulosa (11, 13). Mediante sucesivas congelaciones a -20°C y posteriores descongelaciones a temperatura ambiente, se logró la lisis de los parásitos. La cuantificación proteica del antígeno se llevó a cabo por el método micro-Lowry modificado por Peterson (*protein assay kit*, Sigma®). Con el homogenado obtenido se inmunizaron ratones Balb/c mediante inyección subcutánea de 15 μg de proteínas disueltas en 0,25 ml de solución fisiológica *a/a* adyuvante completo de Freund. Refuerzos (*boosters*) de iguales dosis de antígeno fueron administrados con adyuvante incompleto de Freund a los 14, 24, 48 y 60 días, éste último con doble dosis de antígeno administrado por vía intra-peritoneal. El control de la producción de anticuerpos se realizó por un método inmunoenzimático (ELISA) indirecto (15) con conjugado anti IgG-IgM de ratón marcado con peroxidasa. Sueros de ratones normales fueron utilizados como controles.

Cultivo de células de mieloma, fusión y obtención de hibridomas

Se empleó la línea de mieloma murino NSO; las células se cultivaron en estufa a 37°C con atmósfera de anhídrido carbónico al 5% en botellas para cultivo celular de 260 ml (Nunclon®) que contenían medio Dulbecco Eagle con 15% de suero fetal bovino. Mediante el empleo de polietilenglicol 1450 (Sigma®), estas células se fusionaron con los linfocitos obtenidos del bazo de dos ratones con alto título de anticuerpos, siguiendo la metodología descrita por Goding (8).

Procedimiento post-fusión

La producción de inmunoglobulinas en los sobrenadantes de los hibridomas se investigó en igual forma que la descrita para el control de anticuerpos en ratones. Los hibridomas positivos fueron clonados tres o más veces por



Fig. 1
Equinos con surra en Formosa, Argentina

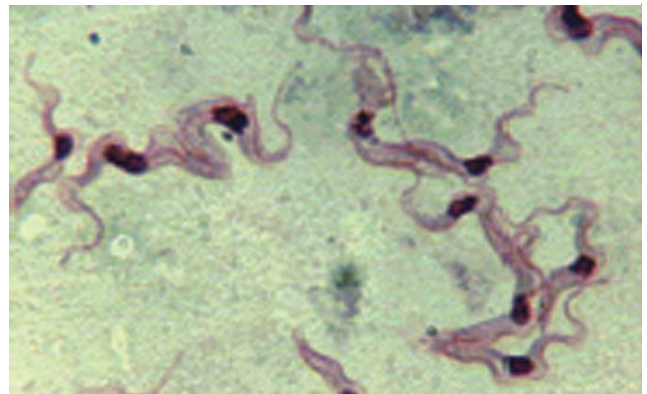


Fig. 2
Aislamiento de *Trypanosoma evansi* (Giemsa 1.000 \times) a partir de equinos con surra en Formosa, Argentina

el método de dilución límite. La isotipificación de las inmunoglobulinas fue realizada por ELISA o inmunodifusión con un kit comercial (*mouse monoclonal antibody isotyping reagents* – Sigma®). El fluido de tres clones productores de IgM en forma estable, anticuerpos monoclonales denominados respectivamente 2-4F6, 21-3E2 y 23-3B7, fue concentrado 10 veces por precipitación al 50% con solución sobresaturada de sulfato de amonio, dializada durante 16 h contra 200 volúmenes de tampón fosfato salino (PBS) y esterilizado por filtro de 0,20 micrones.

Selección de un anticuerpo monoclonal para la prueba de detección de antígenos de *Trypanosoma evansi*

Detección de antígenos en homogenado *Trypanosoma evansi*

Placas micro-ELISA para inmunoensayo fueron sensibilizadas durante 16 h a 4°C - 8°C con 100 μl de un

suelo captura de antígenos (1/2.000), diluido en solución tampón carbonato-bicarbonato pH 9, con anticuerpos policlonales obtenidos por precipitación con sulfato de amonio a partir de un suero hiperinmune de cabra anti-*T. evansi*. Luego de lavarse las placas dos veces durante 5 min. con PBS Tween 20 (PBST) 0,05%, los sitios libres fueron bloqueados con albúmina bovina al 1% en PBS durante 60 min. a 37°C. Las placas se lavaron nuevamente, para colocarse en pocillos duplicados 100 µl de un lisado total de *T. evansi* diluido en PBST en concentraciones de 3 µg a 200 µg de proteínas/ml⁻¹. Se incubó la preparación durante 60 min. a 37°C; se realizaron luego dos lavados para colocar 100 µl de idénticas concentraciones de cada uno de los anticuerpos monoclonales en estudio. Albúmina bovina fue utilizada como control negativo. Después de otra incubación y lavado de iguales características a la descrita, se colocaron, por pocillo, en dilución 1:500, 100 µl de anti-IgM de ratón (específico para cadena µ) conjugado con peroxidasa, anticuerpo preparado en cabra. Las placas se lavaron tres veces y la reacción fue revelada con 2,2'-azino-bis(3-etil benzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) y H₂O₂ (15). Se realizaron las lecturas en densidad óptica a 405 nm al cabo de 30 min. Basándose en los resultados de especificidad y capacidad para detectar antígenos, el anticuerpo monoclonal 2-4F6 fue seleccionado para proseguir los estudios.

Especificidad del anticuerpo monoclonal 2-4F6 frente a antígenos heterólogos

A fin de determinar la especificidad del anticuerpo monoclonal 2-4F6, se realizó una prueba de ELISA indirecta usando extractos solubles de *Babesia equi*, *B. caballi*, *T. cruzi* (cultivo de epimastigotes), *T. equiperdum* y *T. evansi*. Los antígenos se solubilizaron por ultrasonido y se prepararon para sensibilizar microplacas en la forma descrita para la prueba ELISA indirecta aplicada a la detección de la surra (15). El anticuerpo secundario para revelar el anticuerpo monoclonal consistió en inmunoglobulina de cabra anti-IgM de ratón (cadena-µ), conjugada con peroxidasa (Sigma®). En todos los casos la reactividad de los antígenos se comprobó con sueros controles positivos y negativos.

Identificación del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 2-4F6

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Trypanosoma evansi del aislamiento Payaguá cosechados por DEAE-celulosa (11, 13) de la sangre de ratones infectados, fueron suspendidos en tres volúmenes de tampón de lisis pH 6,8 (Tris 1 M:1 ml; ClNa 2 M:1 ml; ácido etilen diamino tetracético [EDTA] 0,2 M:2,5 ml;

iodoacetamida 200 mM:0,5 ml; fenilmetil sulfonil fluoruro [PMSF] 0,1 M:0,5 ml y agua destilada c.s.p. 50 ml). El preparado fue sometido en forma alternada a cinco congelaciones a -20°C y posteriores descongelaciones a temperatura ambiente; se homogeneizó luego cinco veces con jeringa y aguja para centrifugarse 10 min. a 15.000 rpm. El sobrenadante fue recolectado y el procedimiento fue repetido con el sedimento. La concentración proteica del pool de sobrenadantes fue determinada por el método micro-Lowry mencionado anteriormente. El antígeno fue diluido a una concentración aproximada de 4.000 µg de proteínas/ml⁻¹ en tampón disociante con 5% de β-mercaptoetanol (9) y analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) usando el método descrito por Laemmli, según Hames y Rickwood (9). Entre 10 y 20 µl del antígeno, y un control de peso molecular (PM) ambos previamente calentados por 3 min. en agua a 100°C, fueron sembrados en un gel concentrador (*stacking gel*) al 4,5% y separados en gel al 14%. La electroforesis se llevó a cabo por 90 min. a 90 V, empleándose un equipo Bio-Rad Mini Protean 3®. La corrida SDS-PAGE fue posteriormente coloreada con azul de Coomassie 0,25 g/100 ml y fotografiada.

Western Blot

Los antígenos separados por SDS-PAGE fueron por otra parte transferidos por electroforesis a papel de nitrocelulosa de 0,45 µm según la metodología descrita por Towbin y col. (28), empleándose 70 V por 2 h en un equipo Bio-Rad Mini Trans-Blot®. La eficacia de la transferencia fue comprobada por coloración en solución de rojo Ponceau al 0,1% en 5% de ácido acético. Posteriormente la nitrocelulosa fue lavada en agua y cortada en tiras en dirección con las proteínas transferidas. Las tiras se colocaron por 90 min. en solución de bloqueo (PBST 0,5%, leche en polvo 5%); luego se lavaron en agitación por 10 min. tres veces en PBST y se coloraron durante 1 h a 37°C y 16 h a 8°C con el anticuerpo monoclonal 2-4F6 1:200 en PBST albúmina 1%. Medio de cultivo para hibridomas y PBST fueron empleados como controles negativos. Después de lavarse por 15 min. tres veces las membranas se incubaron durante 60 min. a 37°C en PBST albúmina 1%, con anti-IgM de ratón (1:300) conjugado con peroxidasa (Sigma®). Después de realizarse tres lavados en la forma indicada se adicionó el revelador sustrato/cromógeno (3,3 diaminobencidina 15 mg, tampón citrato-fosfato pH 5 60 ml, H₂O₂ 40 µl). Una vez visualizada la reacción, después de aproximadamente 5 min., las tiras se lavaron en agua destilada; a temperatura ambiente se las dejó secar para ser fotografiadas junto al control de peso molecular y al perfil antigénico obtenido por SDS-PAGE. Los antígenos que reaccionaron con el anticuerpo monoclonal fueron identificados por estimación del peso molecular (9) y el perfil antigénico obtenido por SDS-PAGE.

Cuadro I

Especificidad del anticuerpo monoclonal 2-4F6 dirigido contra *Trypanosoma evansi*, mediante la prueba inmunoenzimática (ELISA) indirecta (densidad óptica: 414 nm)

Anticuerpos	Antígenos				
	<i>Trypanosoma evansi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Babesia equi</i>	<i>Babesia caballi</i>	<i>Trypanosoma equiperdum</i>
Suero control positivo	0,240	0,560	0,200	0,250	0,300
Suero control negativo	0,020	0,001	0,000	0,000	0,000
Anticuerpo monoclonal 2-4F6	0,390	0,010	0,000	0,000	0,000

DetECCIÓN DE ANTÍGENOS DE *Trypanosoma evansi* EN SUERO

Seguendo la metodología descrita para detectar antígenos, 36 sueros de equinos fueron sometidos a prueba. Las muestras de suero se emplearon diluidas 1:4 en PBST. Dieciséis muestras de sueros provenían de un brote de surra en Formosa (Argentina). Estas muestras fueron analizadas para buscar anticuerpos y parásitos según la metodología descrita anteriormente (15, 29). Veinte sueros de equinos provenientes de la zona de Argentina libre del parásito fueron empleados como controles no infectados.

Resultados

Producción y selección de anticuerpos monoclonales para el desarrollo de una prueba inmunoenzimática para la detección de antígenos de *Trypanosoma evansi*

Se obtuvieron 32 hibridomas, de los cuales seis resultaron positivos a la prueba ELISA para *T. evansi*. Tras sucesivos cultivos, tres de ellos continuaron produciendo anticuerpos en forma estable; los restantes fueron desechados al dejar espontáneamente de producir anticuerpos.

La isotipificación por ELISA indicó producción de anticuerpos IgM en los tres clones estables y fue corroborada por inmunodifusión para el clon 2-4F6.

Este anticuerpo monoclonal demostró ser específico para *T. evansi* en la prueba ELISA indirecta, pues no reaccionó con ninguno de los antígenos heterólogos de parásitos protozoos (Cuadro I). Además, presentó una mayor capacidad que los restantes anticuerpos monoclonales para detectar antígenos en un lisado total de *T. evansi* (Cuadro II).

Identificación del antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal 2-4F6

El perfil antigénico del *T. evansi* por SDS-PAGE mostró un total de 18 bandas ubicadas entre los PM de 7,2 a 212 kDa.

(Fig. 3b). El anticuerpo monoclonal 2-4F6 reaccionó con dos bandas antigénicas, una de 122 kDa y otra de 85 kDa (Fig. 3b). Los controles del inmunoblot realizado con medio de cultivo o PBST dieron resultados negativos.

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS EN SUERO DE EQUINOS INFECTADOS NATURALMENTE CON *Trypanosoma evansi*

La densidad óptica de 0,055 resultante del promedio + 3 desviación estándar, obtenida en el grupo de animales no infectados, fue considerada como el umbral de diferenciación entre un resultado positivo y un negativo.

En el grupo de equinos con surra, nueve de los diez animales con tripanosomas circulantes en sangre resultaron positivos a la detección de antígenos, al igual que dos animales (n° 103 y 110) en los cuales no se detectaron parásitos en sangre pero sí anticuerpos dirigidos contra *T. evansi* (Cuadro III). Los cuatro equinos restantes resultaron negativos a los tres métodos empleados.

Se comprobó una correlación de 0,93 entre la detección de anticuerpos (15) y la presencia de antígenos circulantes (índice kappa de Cohen de 0,86 con un intervalo de confianza de 0,67-1). Diez de los once animales en los cuales se demostró la presencia de anticuerpos (porcentaje

Cuadro II

Densidades ópticas (414 nm) de una prueba inmunoenzimática (ELISA) para la detección de antígenos en homogenado total de *Trypanosoma evansi*

Antígeno (µg/ml)	Anticuerpos monoclonales		
	2-4F6	21-3E2	23-3B10
200	0,203	0,076	0,056
100	0,195	0,075	0,075
50	0,168	0,054	0,064
25	0,129	0,046	0,058
12	0,122	0,038	0,042
6	0,088	0,032	0,039
3	0,058	0,024	0,030

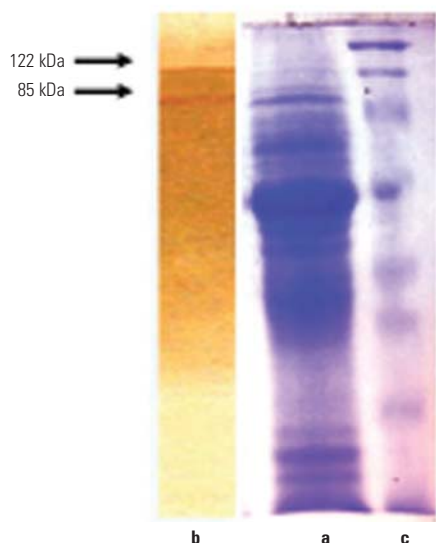


Fig. 3
Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de sodio dodecil sulfato (SDS-PAGE) de un homogenado total de *Trypanosoma evansi* (a) Immunoblot con anticuerpo monoclonal 2-4F6 sobre un lisado total de *T. evansi* transferido a membrana de nitrocelulosa, mostrando una doble banda de precipitación (b) Control de peso molecular (orden decreciente en kDa): 212; 122; 83; 51,8; 35; 28,4; 20; y 7,2 (c)

Cuadro III
Detección de antígenos y anticuerpos en un lote de equinos infectados con *Trypanosoma evansi*

Animal n°	ELISA		
	Diagnóstico parasitológico	Anticuerpo (PP)	Antígeno (DO)
99	+	86	0,150
100	+	128	0,122
101	+	44	0,343
102	+	91	0,189
103	-	91	0,156
105	+	73	0,248
106	+	84	0,473
107	+	71	0,113
108	+	85	0,248
109	+	86	0,420
110	-	89	0,269
111	-	30	0,017
112	-	21	0,000
113	-	43	0,012
114	-	42	0,024
115	+	68	0,042
Controles n = 20	N/R	23	0,013

DO: densidad óptica: 0,055 o mayor considerado como resultado positivo

N/R: no realizado

PP: porcentaje de positividad: 50% o mayor considerado como resultado positivo

de positividad [PP] de 50 o más) también arrojaron resultados positivos a la prueba de detección de antígenos.

No se detectaron antígenos en los 20 sueros controles.

Discusión

El diagnóstico clínico de la surra en equinos resulta impreciso, debido a que esta enfermedad presenta síntomas clínicos similares a los de otras enfermedades anemizantes como la anemia infecciosa y la piroplasmosis equina. La escasa cantidad de parásitos en la sangre en los periodos crípticos y la limitada supervivencia de los flagelados una vez fuera del hospedero dificultan el diagnóstico parasitológico (18). La detección de anticuerpos por ELISA ha dado buenos resultados en términos de sensibilidad y especificidad (15), sin embargo no siempre indica infección activa, dado que los anticuerpos pueden permanecer en forma prolongada después de un tratamiento farmacológico curativo (14, 21).

La detección de antígenos de *T. evansi* fue desarrollada inicialmente por Rae y Luckins, empleando en los reactivos anticuerpos policlonales (24) y posteriormente por Nantulya con anticuerpos monoclonales (22). Estas técnicas alcanzan su mayor eficacia para el diagnóstico cuando se las emplea en combinación con métodos parasitológicos (19), pues por sí solas no detectan la totalidad de los animales con parásitos en sangre. Por esa razón se requiere actualmente de nuevos reactivos dotados de mayor sensibilidad y especificidad (27).

De los tres anticuerpos monoclonales evaluados en este trabajo, el denominado 2-4F6 fue el que presentó mayor sensibilidad para detectar antígenos de *T. evansi* a partir de un lisado total del parásito. La reacción inmunológica de este anticuerpo monoclonal con el antígeno transferido a membranas de nitrocelulosa se observó sobre dos bandas antigénicas cuyo peso molecular era respectivamente de 122 kDa y 85 kDa. Informes anteriores describen el reconocimiento de dos o más bandas por un anticuerpo monoclonal sobre antígenos de *Plasmodium vivax* (26), *Schistosoma mansoni* (25) y *Trypanosoma congolense* (23). Esta situación puede atribuirse a una proteólisis excesiva del antígeno por las proteasas. En este trabajo esta presunción fue descartada al emplearse en el tampón de lisis inhibidores de proteasas como el PMSF, iodoacetamida y EDTA (6). La explicación teórica más aceptada es que el epítipo antigénico reconocido por el anticuerpo monoclonal se encuentra en más de una proteína, las cuales difieren en peso molecular.

En estudios previos sobre la especificidad del anticuerpo monoclonal 2-4F6, concentraciones de 4 µg a 412 µg de

proteínas por ml⁻¹ del antígeno de *T. evansi* bloquearon su actividad entre un 84% y un 92%, mientras que idénticas concentraciones antigénicas de los protozoos hemoparásitos de los equinos del sub-trópico de Argentina, *T. cruzi*, *B. equi* y *B. caballi*, no produjeron inhibición (17).

En una prueba micro-ELISA, la actividad de este anticuerpo monoclonal fue bloqueada en 54% con el antígeno de *T. evansi* a concentración de 2 µg/ml⁻¹, mientras que fue necesario utilizar 32 µg de antígeno de *T. equiperdum* para idéntico propósito, con lo cual se puede concluir que el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 2-4F6 es compartido por ambos tripanosomas; sin embargo la concentración del antígeno portador de este epítipo en *T. equiperdum* sería mínima comparada con *T. evansi*. En la misma investigación este anticuerpo monoclonal no presentó reacción en un sistema de captura de antígenos igual al descrito en el presente trabajo, aún empleándose concentraciones de 200 µg de antígeno por ml⁻¹ (16).

Los resultados preliminares de este trabajo con relación a la detección de antígenos de *T. evansi* en suero mediante una prueba ELISA basada en el empleo del anticuerpo monoclonal 2-4F6 en un brote de surra en equinos en

Formosa, Argentina, muestran un alto nivel de correlación con la presencia del parásito en la sangre y con la detección de anticuerpos. Estos resultados indican el potencial de este anticuerpo monoclonal para su empleo en la prueba ELISA de detección de antígenos. Se requieren futuras evaluaciones con muestras provenientes de diferentes áreas geográficas y en las que los datos se expresen en porcentaje de positividad, de acuerdo con las normas internacionales vigentes (10, 30), que aseguran resultados normalizados.

Agradecimientos

El autor agradece a la Dra. de Benedetti, del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agropecuaria, Buenos Aires, al Dr. Guerrero, de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, y al Dr. de Waal, del ARC-Onderstepoort Veterinary Institute, Sudáfrica, por haber provisto los reactivos utilizados en este estudio, así como al personal de apoyo a la investigación del Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias de Formosa, por sus aportes técnicos.

■

Characterisation of a monoclonal antibody against *Trypanosoma evansi* and its application for detecting circulating antibodies

C.M. Monzón

Summary

Monoclonal antibodies were obtained against *Trypanosoma evansi*. The 2-4F6 IgM monoclonal antibody (Mab) was chosen for the study because of its ability to detect antigens and its specificity (as it did not recognise *T. cruzi*, *T. equiperdum*, *Babesia equi* or *B. caballi*). The immunoblot test revealed that the 2-4F6 IgM Mab recognises epitopes in two antigenic bands, one measuring 85 kDa and the other 122 kDa. An immunoassay for antigen detection in serum using polyclonal antibodies for capture, the Mab 2-4F6 as primary antibody and an antimouse IgM as secondary antibody gave positive results in 10 of the 11 equidae infected with *T. evansi*, whereas 20 controls gave negative results. These research results show that the Mab 2-4F6 and the antigen it recognises are useful in identifying equidae infected with *T. evansi*.

Keywords

Circulating antigen – Equid – Immunoassay – Monoclonal antibody – Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis – Surra – *Trypanosoma evansi* – Western Blot.

■

La caractérisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre *Trypanosoma evansi* et son application à la détection des antigènes circulants

Résumé

Après avoir obtenu une série d'anticorps monoclonaux dirigés contre *Trypanosoma evansi*, l'anticorps monoclonal IgM intitulé 2-4F6 a été sélectionné pour les besoins de cette étude, en raison de sa sensibilité et de sa spécificité vis-à-vis de *T. evansi* (par opposition à *T. cruzi*, *T. equiperdum*, *Babesia equi* ou *B. caballi*). En Western Blot, cet anticorps a reconnu les épitopes sur deux bandes d'antigènes, respectivement de 85 kDa et de 122 kDa. Une épreuve immuno-enzymatique pour la détection d'antigènes utilisant comme anticorps de capture des anticorps polyclonaux, comme anticorps primaire l'anticorps monoclonal 2-4F6 et comme anticorps secondaire un anti-IgM de souris a donné des résultats positifs sur 10 des 11 équidés infectés par *T. evansi*, tandis que les vingt sérums de contrôle restaient négatifs. Les résultats de cette étude suggèrent que l'anticorps monoclonal 2-4F6 et l'antigène qu'il reconnaît pourraient être d'une grande utilité pour détecter les équidés infectés par *T. evansi*.

Mots-clés

Anticorps monoclonal – Antigène circulant – Électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyle sulfate – Épreuve immuno-enzymatique – Équidé – Surra – *Trypanosoma evansi* – Western Blot.

Bibliografía

1. Arias J.F., García F., Rivera M. & López R. (1997). – *Trypanosoma evansi* in capybara from Venezuela. *J. Wildl. Dis.*, **33** (2), 359-361.
2. Clarkson M.J. (1976). – Trypanosomiasis of domesticated animals of South America. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **70**, 125-126.
3. Davison H.C., Thrusfield M.V., Muharsini S., Husein A., Partoutomo S., Rae P.F., Masake R. & Luckins A.G. (1999). – Evaluation of antigen detection and antibody detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epidemiol. Infect.*, **123** (1), 149-155.
4. Davison H.C., Thrusfield M.V., Husein A., Muharsini S., Partoutomo S., Rae P.F. & Luckins A.G. (2000). – The occurrence of *Trypanosoma evansi* in buffaloes in Indonesia, estimated using various diagnostic tests. *Epidemiol. Infect.*, **124** (1), 163-172.
5. Desquesnes M. (1996). – Origin and distribution of New World livestock trypanosomes and their affinity for some mammalian hosts. *In Proc. 1st Symposium on New World Trypanosomes*, 20-22 November, Georgetown, Guyana. Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement – Département d'élevage et de médecine vétérinaire (CIRAD-EMVT) & Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). CIRAD-EMVT, Montpellier, 5-11.
6. Deutscher M.P. (1990). – Methods in enzymology. *In Guide to protein purification*, vol. 182. Academic Press Inc., San Diego, 503-504.
7. Diall O., Nantulya V.M., Luckins A.G., Diarra B. & Kouyate B. (1992). – Evaluation of mono and polyclonal antibody-based antigen detection immunoassays for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in the dromedary camel. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **45** (2), 149-153.

8. Goding J.W. (1987). – Monoclonal antibodies: principles and practice. Academic Press Inc., San Diego, 68-69.
9. Hames B.D. & Rickwood D. (1981). – Gel electrophoresis of proteins. A practical approach, Chapter 1. IRL Press Limited, Oxford, 26-38.
10. Jacobson R.H. (1998). – Validation des épreuves sérologiques pour le diagnostic des maladies infectieuses. In Laboratorios veterinarios para las enfermedades infecciosas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17** (2), 487-506.
11. Lanham S.M. & Godfrey D.G. (1970). – Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Experim. Parasitol.*, **28**, 521-534.
12. Luckins A.G. (1988). – *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today*, **4** (5), 137-142.
13. Monzón C.M. (1986). – Empleo de la cromatografía de intercambio iónico para la purificación del *Trypanosoma equinum* de sangre de ratas experimentalmente infectadas. *Rev. Med. vet. (Buenos Aires)*, **67** (2), 78-80.
14. Monzón C.M. (1987). – Inmunodiagnóstico de la tripanosomiasis equina o mal de caderas, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta. *Rev. Med. vet. (Buenos Aires)*, **68** (4), 196-204.
15. Monzón C.M. (2000). – Validación de una prueba inmunoenzimática indirecta para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma evansi* en equinos de Argentina. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **19** (3), 810-818.
16. Monzón C.M. (2003). – Evaluation of a monoclonal antibody for the differential diagnosis between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum*. In Minutes of the 24th Annual Meeting of the OIE ad hoc Group on Non-Tsetse Animal Transmitted Trypanosomoses (NTTAT) on the occasion of the 71st General Session of the International Committee of the OIE, 18 May, Paris. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), París, Anexo XXV.
17. Monzón C.M. (2004). – Especificidad del anticuerpo monoclonal 2-4F6 *Trypanosoma evansi* frente a los antígenos *Babesia equi*, *Babesia caballi* y *Trypanosoma cruzi*. In Actas de la XXª Reunión de la Sociedad Argentina de Protozoología (SAP), Rosario, 26-28 de mayo. SAP, Santa Fe, 31.
18. Monzón C.M., Jara G.A. & Hoyos C.B. (1995). – Determinación de la supervivencia del *Trypanosoma evansi* en sangre de equinos, empleando el método del microhematocrito. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14** (3), 753-759.
19. Monzón C.M., Jara G.A. & Nantulya V.M. (1995). – Sensitivity of antigen ELISA test for detecting *Trypanosoma evansi* antigen in horses in the subtropical area of Argentina. *J. Parasitol.*, **81** (5), 806-808.
20. Monzón C.M. & Russo A.M. (1996). – Epidemiological review of equine trypanosomosis in Argentina. In Proc. 1st Internet Conference on salivarian trypanosomes. FAO Animal Production and Health Paper No. 136, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Roma, 2-4.
21. Monzón C.M., Mancebo O.A. & Russo A.M. (2003). – Antibody levels by indirect ELISA test in *Trypanosoma evansi* infected horses following treatment with quinapyramine sulphate. *Vet. Parasitol.*, **111**, 59-63.
22. Nantulya V.M. (1989). – Two simple antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Trop. Med. Parasitol.*, **40**, 415-418.
23. Parish N.M., Morrison W.I. & Pearson T.W. (1985). – Identification of an antigen specific to *Trypanosoma congolense* by using monoclonal antibodies. *J. Immunol. (Baltimore)*, **134** (1), 593-597.
24. Rae P.F. & Luckins G. (1984). – Detection of circulating trypanosomal antigens by enzyme immunoassay. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **78** (6), 587-596.
25. Saad A.M., Din N., Kornelis D., Van Zeyl R.J.M. & Deelder A.M. (1994). – Immunologic characterization of two monoclonal antibodies reactive with repetitive carbohydrate epitopes of circulating *Schistosoma mansoni* EGG antigen. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **50** (4), 487-498.
26. Sanchez M.R., Ramirez J.A., Larriva-Sahd J., Rodriguez M.H., Mancilla R. & Ortiz-Ortiz L. (1994). – Antigenic characterization of *Plasmodium vivax* with monoclonal antibodies. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **51** (1), 60-67.
27. Touratier L. (coord.) (2003). – Minutes of the 24th Annual Meeting of the OIE ad hoc Group on Non-Tsetse Animal Transmitted Trypanosomoses (NTTAT) on the occasion of the 71st General Session of the International Committee of the OIE, 18 May, Paris. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), París.
28. Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979). – Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. natl Acad. Sci. USA*, **76** (9), 4350-4354.
29. Woo P.T.K. & Rogers D.J. (1974). – A statistical study of the sensitivity of the haematocrit centrifuge technique in the detection of trypanosomes in blood. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **58**, 319-326.
30. Wright P.F., Nilsson E., Rooij Goes M.A., Lelenta M. & Jeggo M.H. (1993). – Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. In Biotecnología aplicada al diagnóstico de las enfermedades animales. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12** (2), 435-450.