

KOMPARASI UJI SEROLOGIS UNTUK DETEKSI INFEKSI *TRYPANOSOMA EVANSI* PADA KERBAU

Rochmadiyahanto, Khajadaton, Ari Puspita Dewi, Koeswari Imran

Balai Besar Veteriner Wates

ABSTRAK

Salah satu penyakit parasiter endemis pada kerbau di Indonesia adalah surra yang disebabkan oleh infeksi protozoa *T.evansi*. Kunci keberhasilan penanggulangan infeksi *T. evansi* pada kerbau adalah ketepatan dan kecepatan diagnosis. Kerbau yang terinfeksi *T. evansi* tidak selalu menunjukkan gejala patognomonik dan perubahan patologis, sehingga diagnosa laboratorium yang cepat, tepat, akurat, murah, dan efisien sangat dibutuhkan. *Card agglutination test (CATT/T.evansi)* mempunyai sensitifitas 78% dan spesifitas 100% tetapi mengalami kesulitan untuk pemesanan kit. ELISA antibodi mempunyai sensitifitas 89% dan spesifitas 94%, obyektif, dapat untuk surveilen skala luas dan metode dapat di standarisasi dengan presisi yang tinggi. Tujuan penelitian ini adalah menghitung nilai kesesuaian metode Surelisa-Te IgG dan IgM terhadap uji CATT untuk mendeteksi infeksi *T. evansi* pada kerbau. Sebanyak 129 ekor kerbau dilakukan pengambilan serum pada vena jugularis. Setelah darah beku dipisahkan serum disimpan dalam suhu -20° C. Serum dilakukan pengujian CATT, Surelisa-Te IgG dan Surelisa-Te IgM. Hasil penelitian menunjukkan nilai Kappa Surelisa-Te IgG terhadap CATT, Surelisa-Te IgM terhadap CATT dan Surelisa IgM terhadap Surelisa IgG masing-masing 0,26, -0,63 dan 0,11. Nilai kesesuaian yang rendah disebabkan karena masing-masing metode uji mempunyai karakteristik berbeda sesuai fase infeksi dalam mendeteksi *T. evansi*. Diagnosa surra secara serologis untuk surveilen sebaiknya menggunakan beberapa metode diagnosa baik serologis maupun parasitologis karena status infeksi kerbau tidak diketahui.

Kata kunci : CATT, Kerbau, Kappa, Surelisa-Te IgG, Surelisa-Te IgM, status infeksi *Trypanosoma evansi*

PENDAHULUAN

Diagnosa infeksi *T. Evansi* pada kerbau sering mengalami kesulitan karena hewan yang terinfeksi tidak selalu menunjukkan gejala patognomonik dan perubahan patologis (Dargantes, 2010). Kecepatan dan ketepatan diagnosa akan sangat mempengaruhi keberhasilan penanggulangan infeksi *T. evansi* pada kerbau. Metode ulas darah tipis dengan pewarnaan Giemza dapat digunakan untuk identifikasi morfologi secara rinci, tetapi metode ini mempunyai sensitivitas yang rendah karena hospes harus mengalami parasitemia yang tinggi yaitu 12.500 trypanosoma/ml darah (My *et al.*, (2000); 500.000 trypanosoma/ml darah (OIE, 2012) dengan sensitivitas 45,6% (Soodan *et al.*, 1998). Metode hematokrit mampu mendeteksi *T. evansi* jika hewan mengalami parasitemia sebanyak 50-200 trypanosoma/ml darah (OIE, 2012, My *et al.*, 2000; Reid *et al.*, 2001) dengan sensitivitas 71% pada kerbau (Dargantes, 2010). *Card agglutination test for trypanosomosis/T. evansi (CATT/T.evansi)* digunakan untuk mendeteksi antibodi anti *T. evansi*. Davison *et al.* (1999) melaporkan sensitivitas dan spesifitas CATT pada kerbau di Indonesia masing-masing 77-79% dan 100%. Reid dan Copeman (2003) melaporkan sensitivitas dan spesifitas CATT pada sapi di Indonesia masing-masing 83% dan 96% dengan pengenceran serum 1:4. Reid dan Copeman (2003) melaporkan sensitivitas ELISA antibodi 81% dan spesifitas

99% pada sapi yang terinfeksi *T. evansi* di Indonesia. Diagnosa untuk survei infeksi *T. evansi* pada kerbau di Indonesia masih menggunakan metode ulas darah tipis dengan pewarnaan Giemza dan hematokrit. Karena parasitemia terjadi sewaktu-waktu, peneguhan diagnosa dengan menemukan parasit sangat sulit (Tampubolon, 1995). Penggantian suatu metode uji dibutuhkan penelitian nilai sensitivitas dan spesifitas metode uji yang baru (Martin *et al.*, 1987; Thrusfield, 2005). Apabila uji *gold standart* tidak tersedia, maka tidak memungkinkan untuk melakukan uji akurasi (sensitivitas dan spesifitas). Kesesuaian antara dua uji atau lebih yang berbeda dapat dilakukan penilaian tanpa menganggap salah satu uji adalah yang terbaik (Thrusfield, 2005). Uji serologis diharapkan dapat menjadi alternatif selain uji konvensional untuk survei dan peneguhan diagnosa penyakit surra sebagai dasar pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kesesuaian uji CATT dan SURELISA Kit-Te (IgG dan IgM) sebagai alat peneguh diagnosa penyakit surra pada kerbau. Hasil penelitian ini akan memberi alternatif pengujian yang cepat untuk surveilen penyakit surra pada kerbau.

MATERI DAN METODE

Pengambilan spesimen

Sebanyak 129 ekor kerbau diambil sampel serum antara bulan Bulan Agustus 2017 di Kabupaten Brebes dan Pemalang, Propinsi Jawa Tengah. Darah diambil dari vena jugularis menggunakan *vacutainer* EDTA dan non EDTA (Becton Dickinson). Peralatan harus steril dan sekali pakai untuk mencegah penularan secara iatrogenic (OIE, 2012, Dargantes, 2010). Sampel kemudian dimasukkan ke dalam kotak pendingin. Serum disimpan pada suhu -20°C setelah dipisahkan klotnya.

Pengujian spesimen

Card Agglutination Test (CATT) *T. Evansi*. Sampel serum di uji dengan CATT untuk mengetahui keberadaan antibodi *trypanosoma evansi*. Kit CATT dikembangkan oleh Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgia. 50 µL antigen RoTat 1.2 dicampur dengan 25 µL serum kerbau dilarutkan dengan PBS (pH 7.2) dengan perbandingan 1:4 pada kartu yang tersedia. dengan batang pengaduk campuran antigen dan serum diaduk dengan gerakan melingkar kemudian diletakkan diatas rotator kemudian diputar selama 5 menit. Sampel dinyatakan positif bila terbentuk butiran biru (OIE, 2012).

Surelisa-Te. ELISA untuk deteksi anti *T. evansi* IgG menggunakan SURELISA Kit-Te (Balai Besar Penelitian Veteriner, Bogor). Prosedur uji sesuai instruksi produsen. Serum diencerkan dengan perbandingan 1:800 (1 µL serum dalam larutan dapar pengencer (*dilution buffer*) 800 µL). Nilai densitas optik (OD) diukur dengan *ELISA Reader* dengan panjang gelombang pada 450 nm. OD > 0,4 merupakan nilai *cut off* untuk serum

positif. Hasil pengukuran *Optical Density* (OD) yang diperoleh dianalisis dengan perangkat lunak SpectraElisa untuk mendapatkan interpretasi hasil uji. Quality Control (QC) *Standard and Pippeting* harus *Passed* minimal *Acceptable*, jika dibawah *Acceptable* pengujian harus di ulangi dari awal. Interpretasi hasil ELISA ada 4 yaitu *excellent*, *good*, *acceptable*, *repeat* dan *failed*. Minimal hasil uji adalah *acceptable*, jika ada hasil *repeat* atau *failed* maka uji harus diulangi (khusus sampel yang hasilnya *repeat* atau *failed*).

Nilai kappa dihitung menggunakan perangkat lunak Microsoft Excell. Data dianalisis dengan menggunakan tabel 2 x 2. Rumus penghitungan kappa adalah sebagai berikut:

$$OA = (a+d)/n \text{ dimana } n = (a+b+c+d).$$

$$EP+ = x$$

$$EP- = x$$

$$EP = (EP+) + (EP-)$$

$$OA = OP-EP.$$

$$MA = 1-EP$$

$$Kappa = OA/MA$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi Balai Besar Veteriner Wates, Daerah Istimewa Yogyakarta. Penelitian menggunakan sebanyak masing-masing 81 sampel darah, preparat ulas darah dan serum kerbau

Prinsip kerja CATT adalah mendeteksi IgM (*agglutinating pentavalent immunoglobulins* yang mempunyai masa hidup singkat). Uji ini sangat cocok untuk deteksi antibodi yang terbentuk pada awal infeksi atau akhir infeksi. Akurasi uji CATT sudah mendapatkan validasi dari OIE yaitu spesifitasnya 100% (OIE, 2012).

ELISA antibodi mempunyai kelemahan tidak dapat membedakan antibodi dari infeksi aktif atau infeksi pada hewan yang sebelumnya terinfeksi dan sudah sembuh (Dargantes, 2010). Diagnosa penyakit surra dengan ELISA antibodi cocok untuk otomatisasi dan standarisasi dengan presisi yang tinggi sehingga ELISA antibodi menjadi tes yang sangat berguna untuk survei berskala besar untuk menentukan distribusi trypanosomosis (OIE, 2013). SURELISA-Te adalah kit ELISA untuk mendeteksi antibodi spesifik *Trypanosoma evansi* merupakan produk diagnostik yang dikembangkan oleh Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor dengan Balai Veteriner Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Kit ELISA ini dikembangkan untuk mendeteksi antibodi IgG maupun IgM pada hewan yang terinfeksi *Trypanosoma evansi*. Penentuan antibodi IgG dan IgM spesifik terhadap infeksi *T.evansi* sama dengan metode ELISA umumnya. Sumuran mikrotiter yang telah dilapisi protein spesifik dari

T. evansi akan berikatan dengan antibodi anti *T. evansi* dari serum. Setelah sumuran dicuci kemudian ditambahkan *conjugate* maka akan terbentuk ikatan antigen-antibodi. Komplek imun yang telah terbentuk akan terlihat berwarna biru apabila ditambahkan substrat *Tetrametylenbenzidine* (TMB). Perubahan warna biru dapat dihentikan dengan penambahan asam sulfat sehingga terbentuk warna kuning. Warna kuning yang terbentuk sebanding dengan jumlah antibodi IgG/IgM *T. evansi* di dalam serum. Intensitas warna kuning dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 450 nm.

Hasil pengujian serum masing-masing uji ditampilkan dalam Tabel 1. prevalensi *T. evansi* menggunakan CATT lebih tinggi dibandingkan Surelisa-Te IgG maupun IgM. CATT adalah uji komersial dimana antigen terdiri dari trypanosoma RoTat 1.2, jenis antigen permukaan variabel umum untuk semua *T. evansi*. Antigen diaglutinasi oleh antibodi. Uji CATT memiliki kelebihan dibandingkan pewarnaan Giemza atau hematokrit yaitu cepat, mudah dilakukan dan dibaca. Oleh karena itu, tes ini dapat digunakan untuk mempelajari seroprevalensi *T. evansi* dengan sangat mudah dan sensitif di bawah kondisi lapangan (Diall *et al.*, 1994; OIE, 2012; Dargantes, 2010).

Dalam penelitian ini deteksi *T. evansi* dengan Surelisa-Te IgG bisa menjadi menjadi sarana diagnostik yang praktis dan metode yang lebih dapat diandalkan (48 % positif) untuk mendeteksi infeksi pada fase akut dan kronis. Hal ini karena ELISA masih dapat mendeteksi antibodi yang menurun perlahan setelah terapi obat anti trypanosomal dan tetap tinggi selama beberapa minggu setelah parasit telah dihilangkan (Luckins *et al.*, 1979).

Tabel 1. Tabel hasil pengujian 129 sampel dengan CATT dan Surelisa-Te

No	Metode uji	Hasil Uji		Prevalensi
		(+)	(-)	
1	CATT	89	40	69%
2	Surelisa-Te IgG	62	67	48%
3	Surelisa-Te IgM	14	115	11%

Tabel 2. Tabel perhitungan nilai kappa beserta interpretasinya

No	Metode Uji	Nilai Kappa	Kesesuaian
1	CATT vs Surelisa IgG	0,26	Jelek
2	CATT vs Surelisa IgM	0,08	Jelek
3	Surelisa IgG vs IgM	0,11	Jelek

Tabel 2 menunjukkan bahwa semua metode uji tidak ada yang mempunyai nilai kesesuaian baik maupun sangat baik. Nilai kappa yang rendah menunjukkan bahwa antar metode uji merupakan uji yang berbeda. Uji CATT

mendeteksi IgM yang terbentuk pada saat awal infeksi dan hanya berumur pendek. Dari Tabel 1 diketahui sebanyak 69% kerbau sedang mengalami infeksi akut. Sedangkan Surelisa-Te IgG mendeteksi antibodi pada saat infeksi kronis maupun akut. Sebanyak 48% kerbau yang di ambil sampelnya mengalami infeksi kronis maupun akut.

Tabel 3. Tabel rincian pengujian 129 sampel dengan CATT dan Surelisa-Te

No.	Jumlah	Metode Uji		
		CATT	Surelisa IgG	Surelisa IgM
1	9	+	+	+
2	43	+	+	-
3	4	+	-	+
4	35	+	-	-
5	1	-	+	+
6	8	-	+	-
7	29	-	-	-
129				

Hasil mengejutkan didapat dari pengujian Surelisa-Te IgM. Dari Tabel 3 nilai kappa CATT terhadap Surelisa IgM 0,08 yang menunjukkan bahwa kedua uji mempunyai perbedaan yang besar padahal sama-sama mendeteksi IgM. Sebanyak 78 sampel positif CATT tetapi negatif dengan uji Surelisa-Te IgM. Hal ini kemungkinan besar karena antigen yang digunakan dalam Surelisa-Te IgM tidak sensitif mendeteksi IgM dari sampel.

Dalam penelitian ini tidak didapatkan nilai kesesuaian yang tinggi antar metode uji. Hal ini disebabkan karena deteksi *T. evansi* sangat tergantung pada fase infeksi yaitu akut, kronis, *silence* dan *relapse*. Pada fase infeksi akut jumlah parasit dalam darah sangat tinggi sehingga memicu terbentuknya antibodi. Pada fase ini metode uji serologis IgG maupun IgM mampu mendeteksi *T. evansi* dengan baik. Pada fase infeksi kronis jumlah parasit dalam darah sudah turun. Pada fase ini metode parasitologis (pewarnaan Giemza dan MHCT) kurang sensitif untuk mendeteksi *T. evansi*, sebaliknya metode serologis (CATT dan ELISA) mampu mendeteksi infeksi *T. evansi* dengan baik, bahkan ELISA mempunyai sensitivitas yang tinggi pada fase ini. Pada fase infeksi *silent* (misalnya karena ternak mengalami kekurangan pakan pada musim kemarau) metode hematokrit tidak mampu mendeteksi adanya *T. evansi*, CATT sensitivitasnya rendah sedangkan ELISA masih mampu mendeteksi dengan baik (nilai sensitivitasnya sedang-tinggi). Fase infeksi *relapse* yaitu fase pada saat kondisi tubuh kerbau pulih (setelah mengalami kekurangan pakan pada musim kemarau misalnya) dimana infeksi *T. evansi* juga akan meningkat kembali. Pada fase ini metode uji serologis IgM dan IgG mampu mendeteksi infeksi *T. evansi* dengan baik (Desquesnes *et al*, 2015 dalam Nurcahyo, 2017). Kondisi tersebut menjelaskan mengapa

tidak ada metode uji untuk mendeteksi infeksi *T. evansi* yang benar benar akurat.

Hasil perhitungan tersebut menunjukkan bahwa dalam meneguhkan diagnosa *T. evansi* membutuhkan lebih dari satu metode uji tetapi beberapa metode uji untuk saling mendukung hasil diagnosa.. Surelisa-Te IgG bisa digunakan untuk uji tapis mendeteksi infeksi *T. evansi* dan bisa dilanjutkan dengan PCR maupun inokulasi mencit sebagai tes akhir.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Kepala Balai Besar Veteriner Wates atas dukungan dana dan material sehingga penelitian ini bisa berjalan dengan baik. Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada Kepala Dinas Peternakan Kabupaten Brebes dan Pemalang.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymus. 2014. Penyakit Surra (*Trypanosomiasis*) dan Pengendaliannya. Center for Indonesian Veterinary Analytical Studies (CIVAS). <http://civas.net>. Unduh: 23 April 2017.
- Alves L.Castarelli, Boechat.V.C., Couto.R. Macedo, Ferreira L.C, Nicolau J.L, Neves L.B, Millar P.R, Vicente T.T, Oliveira R.V.C, Muniz A.G, Bonna I.C.F, Amendoeira M.R.R., Silva R.C, Langoni H, Scubach T.M.P, Menezes R.C. 2014. Sensitivity and Specifity of serological test, histopathplogy and immunohistochemistry for detection *Toxoplasma gondii* infection in domestic chicken. *Veterinary Parasitology* 346-351.
- Aregawi Wedegebrial Gebrezgabher, Kassa Samson Terefe, Tarekgn Desalegn Kidanie, Brehanu Woldegebriel Tesfamariam, Haile Tilahun Sisay and Kiflewahid Fikre Zeru. 2015. Parasitological and serological study of camel trypanosomiasis (surra) and associated risk factor in Gabi Rasu Zone, Afar, Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* Vol. 7(6), pp. 234-240.
- Bennet G.F. 1962. The hematocrit centrifuge for laboratory diagnosis of hematozoa. *Canadian Journal of Zoology* 40, 124-125. Birhanu Hadush, Roge Stijn, Simon Thomas, Baelmans Rudy, Gebrehiwot Tadesse, Goddeeris Bruno Maria, Buscher Phillipe. 2015. Surra K-SeT, a new immunochromatographic test for serodiagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in domestic animal. *Veterinary Parasitology* 153-157.
- Budiharta.S. dan Suardana. I.W., 2007. Buku Ajar Epidemiologi dan Ekonomi Veteriner. Udayana Press, Surabaya.

- Damayanti R, Graydon RJ, Ladds P.W. 1994. The pathology of experimental *Trypanosoma evansi* infection in the Indonesian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Comparative Pathology* 110, 237-252.
- Dargantes AP, R.S.F. Campbell, D.B. Copeman and S.A. Reid. 2005. Experimental *Trypanosoma evansi* Infection in the Goat. II. Pathology. *Journal Comp. Path.* 2005, Vol. 133, 267–276.
- Dargantes AP, R.T. Mercado, R.J. Dobson, S.A. Reid. (2009). Estimating the impact of *Trypanosoma evansi* infection (surra) on buffalo population dynamics in southern Philippines using data from cross-sectional surveys. *International Journal for Parasitology* 39 1109–1114.
- Dargantes A.P. 2010. Epidemiology, control and potential insect vectors of *Trypanosoma evansi* (surra) in village livestock in southern Philippines. School of Veterinary and Biomedical Sciences Division of Health Sciences Murdoch University.
- Davison H.C, Thrusfield M.V, Husein, A, Muharsini, S, Partoutomo, S, Rae P.F, Masake R And Luckins A.G. 1999. Evaluation of antigen detection and antibody detection tests for *Trypanosoma evansi* infections of buffaloes in Indonesia. *Epidemiol. Infect.*, 123, 149-155.
- Davison, H.C, Thrusfield, M.V, Husein, A, Muharsini, S, Partoutomo, S, Rae, P & Luckins, A.G. 2000. ‘The occurrence of *Trypanosoma evansi* in buffaloes in Indonesia, estimated using various diagnostic tests’. *Epidemiology and Infection*, Vol. 124, No. 1, pp. 163-72.
- Desquesnes M, Bossard G, Thévenon S, Patrel D, Ravel S, Pavlovic D, Herder S,
- Patout O, Lepetitcolin E, Holzmuller P, Berthier D, Jacquiet P, Cuny G (2009b) Development and application of an antibody-ELISA to follow up a *Trypanosoma evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. *Veterinary Parasitology* 162, 214-220.
- Desquesnes M, Philippe Holzmuller, De-Hua Lai, Alan Dargantes Zhao-Rong Lun
- and Sathaporn Jittaplaong. 2013a. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International* Volume 2013.

- Dobson, R.J., Dargantes, A.P., Mercado, RT. And Reid , S.A. 2009. Model for *Trypanosoma evansi* (surra), its control and economic impact on small-hold livestock owners in the Philippines. *International journal for Parasitology*, 39 (10).pp 1115-1123.
- Desquesnes M, Philippe Holzmuller, De-Hua Lai, Alan Dargantes Zhao-Rong Lun
- and Sathaporn Jittaplapong. 2013b. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. *BioMed Research International*.
- Ian Dohoo, Wayne Martin and Henrik Stryhn. 2003. *Veterinary Epidemiologic Research*. AVC Inc., University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, Charlottetown, Prince Edward Island, Canada.
- Elshafie E.I., Sani R.A., Sharma R., Bashir A., Abubakar I.A. 2013. Seroprevalence and risk factor of *Trypanosoma evansi* infection in horse in Peninsular Malaysia. *Research in Veterinary Science* 94, 285:289.
- Fernández D, González-Baradat B, Eleizalde M, González-Marcano E, Perrone T,
- Mendoza M (2009) *Trypanosoma evansi*: A comparison of PCR and parasitological diagnostic tests in experimentally infected mice. *Experimental Parasitology* 121, 1-7.
- Nathan Habila, Mairo H. Inuwa, Idowu A. Aimola, Michael U. Udeh, Emmanuel
- Haruna (2012) Pathogenic mechanisms of *Trypanosoma evansi* infections *Research in Veterinary Science* 93,13–17.
- Hisako Kayama, Kiyoshi Takeda. 2010. The innate immune response to *Trypanosoma crzi* infection. *Microbes and Infection* 12, 511-517.
- Hilali M, Abdel-Gawad A, Nassar A, Abdel-Wahab A (2006) Hematological and biochemical changes in water buffalo calves (*Bubalus bubalis*) infected with *Trypanosoma evansi*. *Veterinary Parasitology* 139, 237-243.
- Holland W.G, Claes F, My L.N, Thanh N.G, Tam P.T, Verloo D, Buscher P, Goddeeris B, Vercruyse J. 2001a. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology* 97, 23-33.

- Holland W.G, My L.N, Thanh N.G, Verloo D, Buscher P, Goddeeris B, Vercruyse
- J. 2002. Evaluation of whole fresh blood and dried blood on filter paper disc in serological test for *Trypanosoma Evansi* in experimentally infected water buffaloes. *Acta Tropica* 81, 159-165.
- Holland W.G. 2003. The Diagnosis Of *Trypanosoma Evansi* And Its Immunosuppressive Effect In Water Buffaloes And Pigs. Universiteit Gent.
- Juyal.D.P. 2005. Newer Prespectives in Diagnosis and Control of Trypanosomiasis (Surra) in Domestic Livestock in India. Departemen of Veterinary Parasitology College of Veterinary Science, Punjab Agricultural University, Ludhiana, India.
- Kumar Rajender, Kumar Sanjay, Virmani Nitin, Yadav S.C. 2015. Transplacental Transmission of *Trypanosoma evansi* From Experimentally Infected Donkey Mare to Neonatal Foal. *Journal of Equine Veterinary Scienci* 35:337-341.
- Kocher Arthur, Desquesne Marc, Kamyngkird Ketsarin, Yangtara Sarawut, Leboucher Emilye, Rodtian Pranee, Dargantes Alan, and Jittapalapong Sathaporn. 2015. Evaluation of an Indirect-ELISA Test for *Trypanosoma evansi* (Surra) in Buffaloes and Its Application to a Serological Survei in Thailand. *BioMed Research International*, Article ID 361037, 8 pages.
- Laha. R and Sasmal N.K. 2009. Detection of *Trypanosoma evansi* infection in clinically ill cattle, buffaloes and horses using various diagnostic tests. *Epidemiol. Infect.*, 137, 1583-1585. Cambridge University Press.
- Luckins A.G. 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitology Today* 4, 137-142.
- Luckins A.G. 1992. Diagnostic methods for trypanosomiasis in livestock. *World Animal Review* 71, 15-20.
- Luckins A.G. 1998a. Epidemiology of surra: unanswered questions. *Journal of Protozoology Research* 8, 106-119.

- Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P. 1987. *Veterinary Epidemiology Principles and Methods*. IOWA State Univ. Press.
- Moussiaux Nicolas Antoine, Saerens Dirk, Desmecht Daniel. 2008. Flow cytometric enumeration of parasitaemia and haematologic changes in trypanosoma-infected mice. *Acta Tropica* 107 139:144.
- Muzari M.O., Burgess G.W., Skerratt L.F., Jones R.E., Duran T.L. Host preferences of tbanid flies based on identification of blood meals by ELISA. *Veterinary Parasitology* 174, 191-198.
- My L.N, Holland W.G, Tam P.T, Thanh N.G, Hoan D.H. 2000. Comparative study of techniques for diagnosis of *Trypanosoma evansi* in buffaloes *Veterinary Science and Techniques* 7, 6-14
- Nurcahyo Wisnu, Priyowidodo Dwi, Prastowo Joko. 2016. *Trypanosoma evansi* detection and vector identification in Central Java and Yogyakarta, Indonesia. *Proceeding of International Conference of Tropical Agriculture*, Yogyakarta, Indonesia, 25-26 October 2016.
- OIE Terrestrial Manual. 2012. *Trypanosomosis evansi* infection (Surra). Chapter 2.1.21.
- OIE Terrestrial Manual. 2013. *Trypanosomosis (tsetse-transmitted)*. Chapter 2.4.17.
- Partoutomo.S., Soleh, M, Poijtedy F, Day A, Wilson AJ, dan Copeman DB. 1995. Studi Patogenesis *Trypanosoma Evansi* Pada Kerbau, Sapi Friesian Holstein Dan Sapi Peranakan Ongole. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1 (1): 41-48.
- Payne R.C, Sukanto I.P, Bazeley K, Jones T.W. 1993. The effect of *Trypanosoma evansi* infection on the oestrous cycle of Friesian Holstein heifers. *Veterinary Parasitology* 51, 1-11.
- Reid S.A, Husein A, Copeman D.B. 2001. Evaluation and improvement of parasitological tests for *Trypanosoma evansi* infection. *Veterinary Parasitology* 102:291–297.
- Reid S.A, Copeman D.B. 2003. The development and validation of an antibody-ELISA to detect *Trypanosoma evansi* infection in cattle in Australia and Papua New Guinea. *Preventive Veterinary Medicine* 61, 195-208.

- Solihat L. (2006) Deteksi Antibodi *Trypanosoma Evansi* Pada Serum Kerbau dengan Komersial Kit CATT (*Card Agglutination Test*). *Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian* 2006.
- Sumba AL, Mihok S, Oyieke FA (1998) Mechanical transmission of *Trypanosoma evansi* and *T. congolense* by *Stomoxys niger* and *S. taeniatus* in a laboratory mouse model. *Medical and Veterinary Entomology* 12, 417-422.
- Tampubolon M.P. 1995. Penelitian Sero-epidemiologik Dari *Trypanosoma evansi* Pada Sapid an Kerbau Menggunakan “Card Aglutination Test” (CATT) di Jawa Barat, Indonesia. *Media Veteriner* Vol. II (1).
- Thekiso O.M.M, Inoue N, Kuboki N, Tuntasuan D, Bunnoy W, Borisutsuwan S,
- Igarashi I, Sugimoto C. 2005. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP), PCR and parasitological tests for detection of *Trypanosoma evansi* in experimentally infected pigs. *Veterinary Parasitology* 130, 327-330.
- Thrusfield M.V. 2007. *Veterinary epidemiology*. 3rd edition. Blackwell Science Limited, Oxford, UK.
- Waffa A. Ahmed, Shaimaa A. Majeed, Ameer H. Abdul Ameer, Nawal D Mahmmud, Nameer I saeed, Luma Y Hanaa. 2016. Sensitivity and Specificity of Various Serological Test for Detection of *Breucella spp.* Infection in Male Goats and Sheep. *Advance in Microbiology*, 6:98-103.
- Wisnu Nurcahyo. 2017. *Penyakit Surra pada Hewan dan Ternak*. Samudra Biru, Yogyakarta.
- Yadav S.C, Kumar Rajender, Manuja Anju, Goyal Liza, Gupta A.K. 2014. Early detection of *Trypanosoma evansi* infection and monitoring of antibody levels by ELISA following treatment. *J Parasite Dis* 38 (1):124-127.
- Zelalem Ayana, Diriba Lemma, Birhanu Abera and Eyob Ethica. 2015. Prevalence of small ruminant trypanosomosis in Assosa and Homosha districts, Benishangul Gumuz Regional State, North Westh Ethiopia. *Journal of Veterinary and Animal Medicine* Vol. 7(5) pp 186-192.