

Pola Parasitemia dan Kematian Mencit yang Diinfeksi *Trypanosoma evansi* Isolat Indonesia

Subekti DT, Sawitri DH, Wardhana AH, Suhardono

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114
Email: subekti.vmd@lycos.com

(Diterima 19 Agustus 2013 ; disetujui 25 Oktober 2013)

ABSTRACT

Subekti DT, Sawitri DH, Wardhana AH, Suhardono. 2013. Parasitaemia pattern and mortality of mice infected by Indonesian Isolate of *Trypanosoma evansi*. JITV 18(4): 274-290. DOI: 10.14334/jitv.v18i4.334.

Trypanosomiasis (Surra) is one of the parasitic diseases is endemic and deadly for horses and buffalo in Indonesia. The etiology of the disease is a *Trypanosoma evansi*. Some *T. evansi* isolates had been isolated and cryopreserved. Those isolates had not been studied for their differences in virulence, particularly with regard to the pattern of parasitaemia and their ability to promote mice mortality. Therefore in this study the differences in virulence was studied. DDY mice were divided in to 19 groups according to each isolate to be tested. Each group consisted of 5 mice. Infection were carried intraperitoneally at a dose of 10⁴ *Trypanosoma*/mice. Mice were examined every two days. Blood samples were taken from tail's peripheral blood and were examined under light microscope. Parasite were quantitatively counted using Neubauer chamber. Parasitemia and mice survival were observed for 30 days or until all mice died. The results indicated that there was significant difference among the isolates. Through out the nineteenth isolate scan could be grouped into 3 different biotypes associated with patterns of parasitemia and their ability to kill mice. Biotype1 was the most virulent with the ability to promote mice mortality ≤ 8 days post-infection (dpi). The biotype2 and 3 were the lowest compared to biotype 1. Biotype2 had an undulating parasitaemia, where as biotype 3 showed persistently high parasitaemia with the ability to promote mice mortality ≥ 14 dpi. The results also indicate the presence of mixed infections of biotypes that exist in one isolate of *T. evansi*.

Key Words: *Trypanosoma evansi*, Biotype, Virulence, Mixed infection, Parasitaemia

ABSTRAK

Subekti DT, Sawitri DH, Wardhana AH, Suhardono. 2013. Pola parasitemia dan kematian mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat Indonesia. JITV 18(4): 274-290. DOI: 10.14334/jitv.v18i4.334.

Trypanosomiasis (Surra) merupakan salah satu penyakit parasiter yang endemik dan mematikan kuda dan kerbau di Indonesia. Penyebab penyakit tersebut adalah protozoa darah *Trypanosoma evansi*. Beberapa isolat *T. evansi* telah berhasil diisolasi dan disimpan kering beku dalam nitrogen cair. Isolat-isolat tersebut sampai saat ini belum dipelajari perbedaan virulensinya, terutama yang berkaitan dengan pola parasitemia dan kemampuan membunuh mencit. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dipelajari perbedaan virulensinya. Mencit DDY dibagi menjadi 19 kelompok sesuai dengan masing-masing isolat yang akan diuji. Setiap kelompok terdiri atas 5 mencit. Infeksi masing-masing isolat dilakukan secara intraperitoneal dengan dosis 10⁴ trypanosoma/ekor. Setiap dua hari sekali dilakukan pemeriksaan parasitemia dari darah tepi di ekor serta diamati daya hidupnya. Pemeriksaan parasitemia dilakukan secara kuantitatif dan dilakukan sampai 30 hari pengamatan atau sampai semua mencit mengalami kematian. Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan keganasan diantara ke 19 isolat yang diuji. Seluruh isolat yang diuji dapat dikelompokkan kedalam 3 biotipe yang berbeda terkait dengan pola parasitemia dan kemampuan membunuh mencit. Biotipe 1 merupakan kelompok yang paling virulen dengan kemampuan membunuh ≤ 8 hari paska infeksi (hpi). Adapun Biotipe 2 dan 3 merupakan kelompok yang virulensinya lebih rendah dibandingkan dengan biotipe 1. Biotipe 2 memiliki pola parasitemia undulan sedangkan biotipe 3 ditandai parasitemia tinggi dalam waktu yang lama dengan kemampuan membunuh mencit ≥ 14 hpi. Hasil penelitian juga mengindikasikan adanya infeksi campuran dari biotipe yang ada didalam satu isolat *T. evansi*.

Kata Kunci: *Trypanosoma evansi*, Biotipe, Virulensi, Infeksi Campuran, Parasitemia

PENDAHULUAN

Trypanosomiasis (Surra) merupakan salah satu penyakit yang endemik di Indonesia. Surra disebabkan oleh protozoa *Trypanosoma evansi* dan menyerang

berbagai jenis hewan, terutama kuda, sapi dan kerbau. Kasus terbaru di Indonesia terjadi di Pulau Sumba Propinsi Nusa Tenggara Timur pada tahun 2010-2011. Kasus tersebut mengakibatkan 4268 (kuda 1608, kerbau 2464, sapi 196) ekor dinyatakan trypanosomiasis

(Dirkeswan 2012). Kematian akibat surra di pulau Sumba tersebut dilaporkan sebanyak 1760 ekor, terdiri dari kuda 1159 ekor, kerbau 600 dan sapi 1 ekor (Dirkeswan 2012). Beberapa isolat *T. evansi* dari berbagai kasus surra di Indonesia telah berhasil dikoleksi, diantaranya dari wilayah wabah di Sumba Timur.

Kepekaan ternak (sapi, kerbau, kuda, domba, kambing) berbeda-beda terhadap infeksi *T. evansi*. Kuda dan Unta merupakan hewan yang paling peka, kemudian diikuti kerbau dan sapi (Dirkeswan 2012). Demikian pula kepekaan beberapa galur mencit juga berbeda-beda terhadap *T. evansi*. Perbedaan kepekaan beberapa galur mencit terhadap *T. evansi* telah dilaporkan oleh Reid & Husein (1998) yang menggunakan mencit galur ARC, Quakenbush, BALB/c, DPJ, CBA/CaH and C57BL/6J. Perrone-carmona et al. (2006) juga telah melaporkan perbedaan kepekaan mencit BALB/c, C57BL/6, DBA/2, NMRI, NIH dan CD1 pada infeksi *T. evansi* yang diisolasi dari kuda di Venezuela. Hal serupa juga telah banyak dilaporkan tentang perbedaan kepekaan galur mencit terhadap infeksi *T. congolense* maupun *T. brucei*. Smuts (2009) melaporkan adanya perbedaan kepekaan pada mencit galur Swiss Outbred, C57BL/6, CBA/CaH, C3H dan ARC pada infeksi *T. brucei* (*gambiense*).

Sejauh ini studi tentang perbedaan keganasan (virulensi) masing-masing isolat *T. evansi* pada mencit masih terbatas. Verdillo et al. (2012) dan Mekata et al. (2013) melaporkan perbedaan virulensi *T. evansi* dari beberapa isolat Filipina dari Pulau Luzon dan Mindanao pada mencit BALB/c. Pada laporan tersebut tidak diketahui perubahan profil hematologi, khususnya PCV dan eritrosit secara kontinyu. Demikian pula perbedaan pola parasitemia pada darah mencit secara kontinyu juga tidak diketahui dengan tepat pada percobaan tersebut. Oleh karena itu, dilakukan studi untuk mengetahui perbedaan virulensi dari beberapa isolat *T. evansi* dari beberapa wilayah di Indonesia berdasarkan pola parasitemia dan mortalitas (kematian) mencit DDY yang diinfeksi *T. evansi*.

MATERI DAN METODE

Propagasi isolat *Trypanosoma evansi*

Isolat *T. evansi* yang digunakan dalam penelitian berasal dari beberapa daerah di Indonesia. Sebanyak 19 isolat *T. evansi* (Tabel 1) diremajakan dan diperbanyak dengan disuntikkan pada mencit secara *intrapertoneal* (i.p). Mencit diamati setiap hari dengan cara memotong sebagian kecil vena pada ujung ekor dan diamati secara natif adanya parasitemia. Apabila parasitemia telah mencapai 10^7 - 10^8 trypanosoma/mL darah, maka isolat

T. evansi tersebut siap untuk digunakan dalam penelitian.

Infeksi *Trypanosoma evansi* dan pengamatan daya hidup

T. evansi yang telah siap digunakan diambil dari darah perifer (vena pada ujung ekor atau jantung) dengan menggunakan antikoagulan heparin dan PBSG (PBS-Glukosa). Selanjutnya 1 - 10 μ L darah yang mengandung *T. evansi* diencerkan 100 - 1000 x (tergantung tingkat parasitemianya) dengan PBSG. Pada saat akan diencerkan, darah yang mengandung *T. evansi* ditambahkan dengan SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 1% terlebih dahulu sebelum ditambahkan PBSG. Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan dosis 10^4 trypanosoma/ekor mencit dan disuntikkan secara i.p dengan volume sekitar 0,3 mL/ekor. Mencit dibagi menjadi 19 kelompok sesuai dengan isolat yang akan diuji. Masing-masing kelompok terdiri atas lima ekor mencit. Setelah diinfeksi, mencit diamati daya hidupnya setiap hari dan diperiksa parasitemianya setiap dua hari sekali.

Penghitungan parasitemia dalam pembuluh darah perifer

Ujung ekor dipotong dan darah ditampung ($\pm 10 \mu$ L) dan di campur dengan SDS 1% (1:1). Segera setelah dicampur homogen, darah diencerkan dalam PBSG dengan perbandingan (1:100 atau 1:1000) sesuai derajat parasitemia. Campuran darah - SDS 1% dan PBSG dihomogenisasi dan kemudian diperiksa dengan menggunakan *haemocytometer* (*Neubauer Improved*). Jumlah parasit dihitung dalam kamar hitung leukosit dan ditetapkan jumlah parasitnya dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Jumlah parasit/mL} = A \times B \times 10^4$$

A = Jumlah Trypanosoma yang terhitung di ruang leukosit

B = Pengenceran suspensi saat akan dilakukan penghitungan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebaran kematian mencit DDY dan LD₅₀

Sebanyak 19 isolat *T. evansi* dari berbagai daerah di Indonesia telah di uji virulensinya pada mencit DDY. Diantara ke-19 isolat tersebut memiliki estimasi LD₅₀ yang berbeda-beda. LD₅₀ adalah kematian akumulatif sebanyak 50% dari jumlah mencit yang diuji setelah diinfeksi *T. evansi* (dosis infeksi 10^4 /ekor mencit).

Tabel 1. Deskripsi *Trypanosoma evansi* yang diisolasi dari beberapa daerah di Indonesia untuk diketahui virulensinya pada mencit DDY

Asal hewan	Kabupaten/Kota - Provinsi	Kode	Tahun diisolasi
Kerbau	Bangkalan - Jawa Timur	EJ1	1988
Sapi PO	Banyuwangi - Jawa Timur	EJ2	1992
Kerbau	Demak - Jawa Tengah	CJ1	1994
Kerbau	Pekalongan - Jawa Tengah	CJ2	1996
Kerbau	Purworejo - Jawa Tengah	CJ3	1994
Kerbau	Pemalang - Jawa Tengah	CJ4	1996
Kerbau	Sukabumi - Jawa Barat	WJ	2008
Sapi Bali	Metro - Lampung	L	1992
Sapi Bali	Enrekang - Sulawesi Selatan	SC1	1986
Kerbau	Gowa - Sulawesi Selatan	SC2	1984
Sapi	Bolaang Mongondow - Sulawesi Utara	NC	1982
Sapi	Banjar - Kalimantan Selatan	SB1	1991
Kerbau	Amuntai - Kalimantan Selatan	SB2	1992
Kerbau	Sumba 1 - NTT	NT1	2012
Kerbau	Sumba 2 - NTT	NT2	2012
Kerbau	Sumba 3 - NTT	NT3	2012
Kerbau	Sumba 4 - NTT	NT4	2012
Kerbau	Sumba 5 - NTT	NT5	2012
Kerbau	Sumba 6 - NTT	NT6	2012

Semua Isolat Sumba berasal dari Kabupaten Sumba Timur (dari satu desa)

Secara umum terdapat tiga grup besar terjadinya waktu kematian hingga mencapai 50% mencit uji, yaitu grup A ($LD_{50} \leq 7$ hari), grup B ($LD_{50} > 7$ hari sampai < 14 hari) dan grup C ($LD_{50} \geq 14$ hari). Kematian seluruh hewan coba (LD_{100}) paling cepat adalah 6 hari, sedangkan paling lambat > 20 hari (Tabel 2).

Berdasarkan perincian distribusi kematian mencit paska infeksi *T. evansi* pada pengamatan setiap dua hari sekali selama 30 hari menunjukkan adanya tiga pola yang berbeda. Pola pertama adalah kematian yang dominan ($\geq 60\%$) terjadi pada hari ke - 6 paska infeksi (6 hpi). Pola pertama tersebut terjadi pada 10 isolat, yaitu EJ1, EJ2, CJ1, CJ3, SC1, NC, L, SB1, WJ dan NT1 (Tabel 2). Pola kedua yaitu kematian yang dominan terjadi pada hari ke-14 hpi atau lebih (≥ 14 hpi). Termasuk dalam pola kedua ini adalah isolat CJ4 dan NT2. Adapun pola ketiga yaitu tersebarnya kematian mencit pada hari ke-4 sampai > 20 hpi. Pola ketiga tersebut diketemukan pada 7 isolat, yaitu CJ2, SC2, SB2, NT3, NT4, NT5, NT6. Apabila dilakukan penggabungan, maka akan diketahui bahwa grup A memiliki sebaran kematian pola pertama.

Adapun grup C memiliki sebaran kematian pola kedua. Sebaliknya grup B memiliki sebaran kematian bersesuaian dengan pola ketiga.

Periode prepaten dan lama hidup mencit (*survival time*) DDY

Periode prepaten adalah waktu yang dihitung sejak mencit diinfeksi sampai parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer. Periode prepaten pada penelitian ini berkisar antara 2-6 hari paska infeksi (hpi). Sekitar 78,95% isolat (15/19) memiliki periode prepaten 2-3 hari, kemudian 15,79% isolat (3/19) memiliki periode prepaten sekitar 4 hari dan hanya 5,26% isolat (1/19) memiliki periode prepaten 6 hari (Tabel 2). Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Perrone-carmona et al. (2006) dan Mekata et al. (2013). Perrone-carmona et al. (2006) melaporkan bahwa isolat *T. evansi* dari Venezuela yang diinfeksi pada 6 galur mencit yang berbeda menghasilkan periode prepaten seragam, yaitu 6 hpi. Sebaliknya 10 isolat *T. evansi* dari Pulau Luzon dan

Mindanao, Filipina yang diinfeksi ke mencit BALB/c didapatkan periode prepaten dari 5,3-10,9 hpi Mekata et al. (2013). Namun demikian, cara dan dosis infeksi yang dipergunakan antara Perrone-carmona et al. (2006), Mekata et al. (2013) dan dalam penelitian ini berbeda.

Ditinjau dari sisi periode prepaten pada mencit, ke-19 isolat Indonesia memiliki kemampuan yang lebih tinggi dalam menyebar kedalam sistem sirkulasi dibandingkan isolat dari Venezuela maupun isolat dari Filipina. Semakin cepat parasit membelah dan menginvasi sistem sirkulasi, maka semakin singkat pula periode prepatennya. Oleh sebab itu diduga bahwa isolat asal Indonesia memiliki virulensi yang tinggi. Dugaan tersebut diperkuat dengan analisis lama hidup mencit setelah diinfeksi *T. evansi*.

Adapun rata-rata lama hidup (*survival time*) dari mencit yang diinfeksi *T. evansi* dari beberapa isolat asal Indonesia juga memperlihatkan keragaman yang besar mulai dari 3 – 17 hpi (Tabel 2). Namun jika lama hidup dihitung sejak pertama kali parasitemia (*survival time to first parasitemia*) terdeteksi dalam darah perifer (periode prepaten), maka lama hidup mencit yang diinfeksi *T. evansi* menjadi lebih singkat. Beberapa isolat menyebabkan lama hidup pasca periode paten (LHP3) yang sangat singkat pada mencit, yaitu kurang dari 4 hari. Isolat yang menyebabkan LHP3 kurang dari 4 hari adalah EJ1, EJ2, CJ1, CJ2, CJ3, SC1, NC, L, dan SB1 (11 isolat). Beberapa isolat lainnya menyebabkan LHP3 yang lebih lama, yaitu lebih dari 12 hari. Isolat yang menyebabkan LHP3 lebih dari 12 hari adalah isolat *T. evansi* dari Pemalang dan Sumba 2 (CJ4 dan NT2). Adapun isolat *T. evansi* lainnya menyebabkan LHP3 yang menyebar dari 4-12 hari.

Gillingwater et al. (2007) telah melakukan perbandingan antar 11 isolat *T. evansi* dari 9 negara yang diinfeksi pada mencit NMRI. Hasilnya diketahui bahwa rata-rata lama hidup mencit tersebut adalah 5 - 8 hpi. Hasil tersebut nampaknya lebih mendekati dengan sebagian besar isolat *T. evansi* yang digunakan dalam penelitian ini. Sebaliknya, Baral et al. (2007) telah menginfeksi *T. evansi* isolat dari Kenya (Ketri 2480) pada mencit C57BL/6 dan diketahui bahwa rata-rata lama hidup mencit tersebut adalah 66,33 hpi. Namun, Barkhuizen et al. (2007) juga menggunakan isolat *T. evansi* dan galur mencit yang sama dengan Baral et al. (2007) memperoleh hasil rata-rata lama hidup mencit yang berbeda, yaitu 47 hpi. Rata-rata lama hidup yang dicapai oleh mencit yang diinfeksi *T. evansi* oleh Baral et al. (2007) dan Barkhuizen et al. (2007) jauh lebih lama dibanding ke 19 isolat *T. evansi* dari Indonesia yang digunakan dalam penelitian ini. Pada penelitian ini rata-rata lama hidup mencit setelah infeksi *T. evansi* dari beberapa isolat Indonesia berkisar 3 - 17 hpi dengan waktu kematian paling lama adalah 22 hpi. Bahkan hasil percobaan

yang dilakukan oleh Baral et al. (2007) dan Barkhuizen et al. (2007) pun menghasilkan rata-rata lama hidup yang berbeda cukup jauh, yaitu sekitar 20 hari. Hasil penelitian kami nampaknya lebih dekat dengan hasil penelitian yang dilakukan Verdillo et al. (2012) dan Mekata et al. (2013). Kedua kelompok peneliti tersebut menggunakan isolat *T. evansi* yang diisolasi dari Filipina.

Tiga isolat *T. evansi* dari Filipina, yaitu pulau Luzon, Visayas dan Mindanao diinfeksi ke mencit BALB/c (Verdillo et al. 2012). Ketiga isolat tersebut menyebabkan 100% kematian mencit sebelum hari ke - 8 pasca infeksi. Isolat Visayas menyebabkan kematian 70% mencit pada 3 hpi dan 30% pada 4 hpi. Sebaliknya, isolat Luzon menyebabkan 90% kematian pada 5 hpi dan 10% kematian pada 4 hpi. Adapun isolat Mindanao menyebabkan 70% kematian pada 5 hpi, 10% pada 4 hpi dan 20% pada 6 hpi. Pola dan distribusi kematian oleh ketiga isolat Filipina tersebut serupa dengan 10 isolat *T. evansi* asal Indonesia (grup A), yaitu isolat CJ1, CJ3, EJ1, L, SB1, WJ, EJ2, SC1, NC dan NT1 (Tabel 2).

Mekata et al. (2013) telah menginfeksi 10 isolat *T. evansi* dari Filipina pada mencit BALB/c dan diketahui bahwa rata-rata lama hidup mencit berkisar antara 11,2 - 19,8 hpi. Pada penelitian ini, rata-rata lama hidup mencit yang diinfeksi dengan 19 isolat *T. evansi* dari Indonesia berkisar antara 10 - 17,2 hpi. Dengan demikian, terdapat kemiripan isolat *T. evansi* dari Filipina dengan isolat dari Indonesia dalam hal rata-rata lama hidup mencit, meskipun pada penelitian ini digunakan mencit galur DDY. Isolat *T. evansi* yang digunakan oleh Verdillo et al. (2012) maupun Mekata et al. (2013) sama-sama berasal dari Filipina namun memiliki kemampuan yang sangat berbeda dalam membunuh mencit BALB/c. Tidak diketahui dengan jelas apakah isolat yang digunakan kedua kelompok peneliti tersebut sama ataukah tidak. Namun terdapat indikasi adanya kehilangan atau berkurangnya infektifitas *T. evansi* yang digunakan oleh Mekata et al. (2013). Hal ini diduga terkait dengan adanya proses propagasi yang dilakukan oleh Mekata et al. (2013) dengan cara *axenic culture* (kultur *in vitro*) yang dapat mengakibatkan kehilangan infektifitas dari isolat *T. evansi* sebagaimana dinyatakan oleh Queiroz et al. (2000).

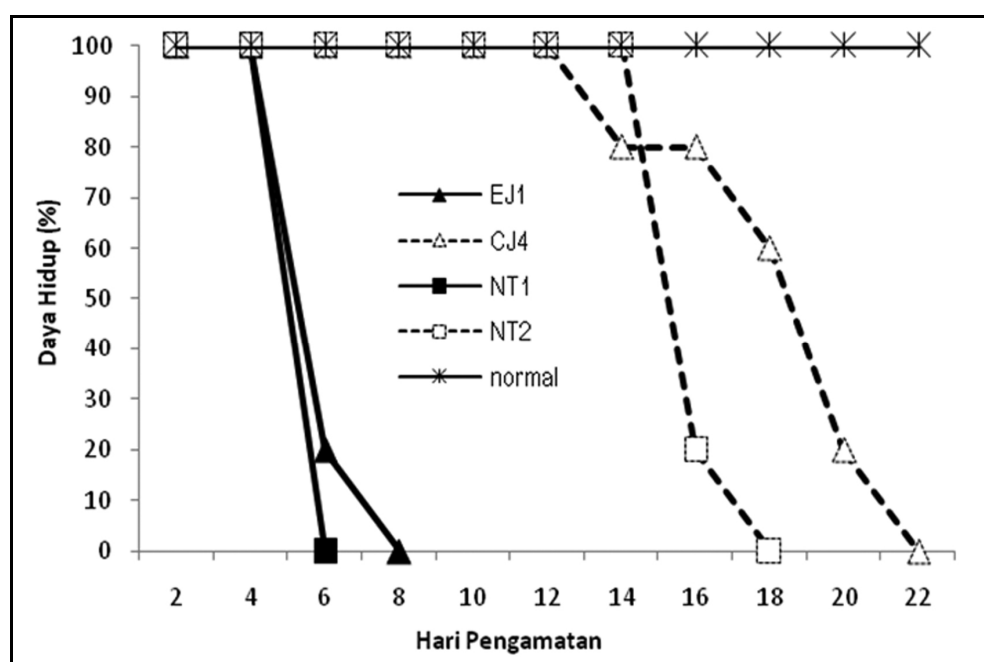
Berdasarkan sebaran kematian mencit, nilai LD₅₀, periode prepaten dan lama hidup (*survival time*) mencit diketahui adanya dua grup yang berbeda sangat mencolok yaitu grup A dan grup C (Gambar 1). Pada grup A berkumpul 10 isolat yaitu CJ1, CJ3, EJ1, L, SB1, WJ, EJ2, SC1, NC dan NT1, sedangkan grup C yaitu isolat NT2 dan CJ4. Adapun 7 isolat lainnya adalah grup B yang memiliki beberapa karakter yang tumpang tindih dengan kedua grup sebelumnya.

Tabel 2. Deskripsi patobiologi beberapa isolat *Trypanosoma evansi* dari Indonesia yang diinfeksi pada mencit DDY

Isolat	Periode Prepaten (hpi)	Lama Hidup (hpi)	LHP3 (hpi)	Estimasi waktu tercapai LD ₅₀ (hari)	Estimasi waktu tercapai LD ₁₀₀ (hari)	Virulensi*		Distribusi Kematian Mencit Pada hari ke							
						Matematis	Biotipe	4 th	6 th	8 th	10 th – 12 th	14 th	16 th	18 th	≥20 th
EJ1	4	4,4±0,4	0,8	5,61	8	High	1	-	80%	20%	-	-	-	-	-
EJ2	2,8±0,49	4	1,2	5	6	High	1	-	100%	-	-	-	-	-	-
CJ1	2	3,2±0,49	1,2	4,11	6	High	1	40%	60%	-	-	-	-	-	-
CJ2	2,4±0,4	4,8±0,8	2,4	6,19	10	High	1	-	80%	-	20%	-	-	-	-
CJ3	2,4±0,4	4,8±0,49	2,4	5,84	8	High	1	-	60%	40%	-	-	-	-	-
CJ4	4,4±0,4	17,2±1,49	12,8	18,3	22	Low	2	-	-	-	0%	20%	0%	20%	60%
SC1	2	4	2	5,61	8	High	1	-	100%	-	-	-	-	-	-
NC	2	4	2	5,61	8	High	1	-	100%	-	-	-	-	-	-
L	2	4,4±0,4	2,4	5	6	High	1	-	80%	20%	-	-	-	-	-
SB1	2,8±0,8	4,4±0,4	1,6	10,16	18	High	1	-	80%	20%	-	-	-	-	-
WJ	2	4,4±0,4	2,4	5	6	High	1	-	80%	20%	-	-	-	-	-
SC2	2	9,2±2,94	7,2	5,61	8	Moderate	1,2,3	20%	20%	-	20%	-	-	40%	-
SB2	2,2±0,2	10,6±1,4	8,4	11,16	18	Low	1,2,3	-	20%	10%	10%	30%	10%	20%	-
NT1	2	4	2	5	6	High	1	-	100%	-	-	-	-	-	-
NT2	2	14,4±0,4	12,4	15,6	18	Low	2,3	-	-	-	-	-	80%	20%	-
NT3	6±0,82	11±2,082	5	10,5	18	Low	1,3	-	20%	20%	20%	20%	-	20%	-
NT4	2	7,6±1,47	5,6	8,42	14	Moderate	1,3	-	20%	40%	20%	20%	-	-	-
NT5	4,8±0,49	9,4±1,78	4,6	10,05	14	Moderate	1,3	-	20%	-	20%	60%	-	-	-
NT6	2,4±0,4	10±1,09	7,6	11,08	≥ 14	Low	1,2,3	-	-	20%	40%	20%	20%	-	-
$\bar{x} \pm SE$	-	7,17±0,92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LHP3 = Lama hidup paska periode prepaten. Virulensi ditetapkan berdasarkan dua aspek:

- (1) Aspek matematis sesuai kriteria Mekata et al. (2013): “High” apabila $\bar{x} + SE \leq 6,24$; “Low” apabila $\bar{x} - SE \geq 8,09$. Nilai yang tidak memenuhi kedua kriteria tersebut digolongkan dalam kategori “Moderate”
- (2) Aspek biologis/pathogenesis yang dikategorikan menjadi tiga, biotipe 1, biotipe 2 dan biotipe 3. LD₅₀ dihitung dengan menggunakan analisis regresi linier, LD₁₀₀ ditetapkan berdasar hari terakhir dimana mencit semuanya telah mati



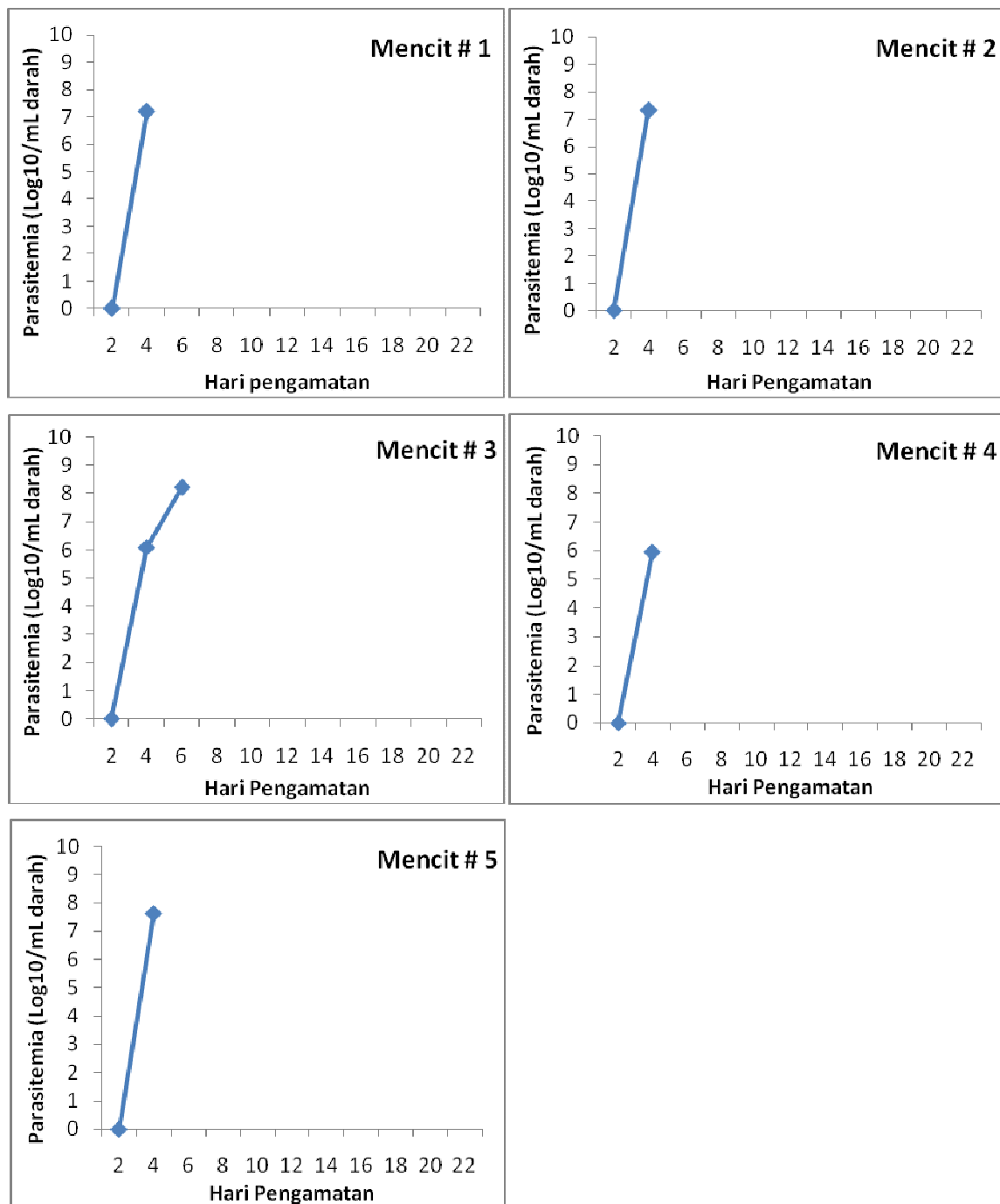
Gambar 1. Daya hidup mencit yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* (10^4 /ekor) dari isolate: EJ1, CJ4, NT1 dan NT2
 EJ1 = Isolat Bangkalan
 CJ4 = Isolat Pemalang
 NT1 = Isolat Sumba 1
 NT2 = Isolat Sumba 2

Pola parasitemia dan kematian mencit DDY oleh infeksi *Trypanosoma evansi*

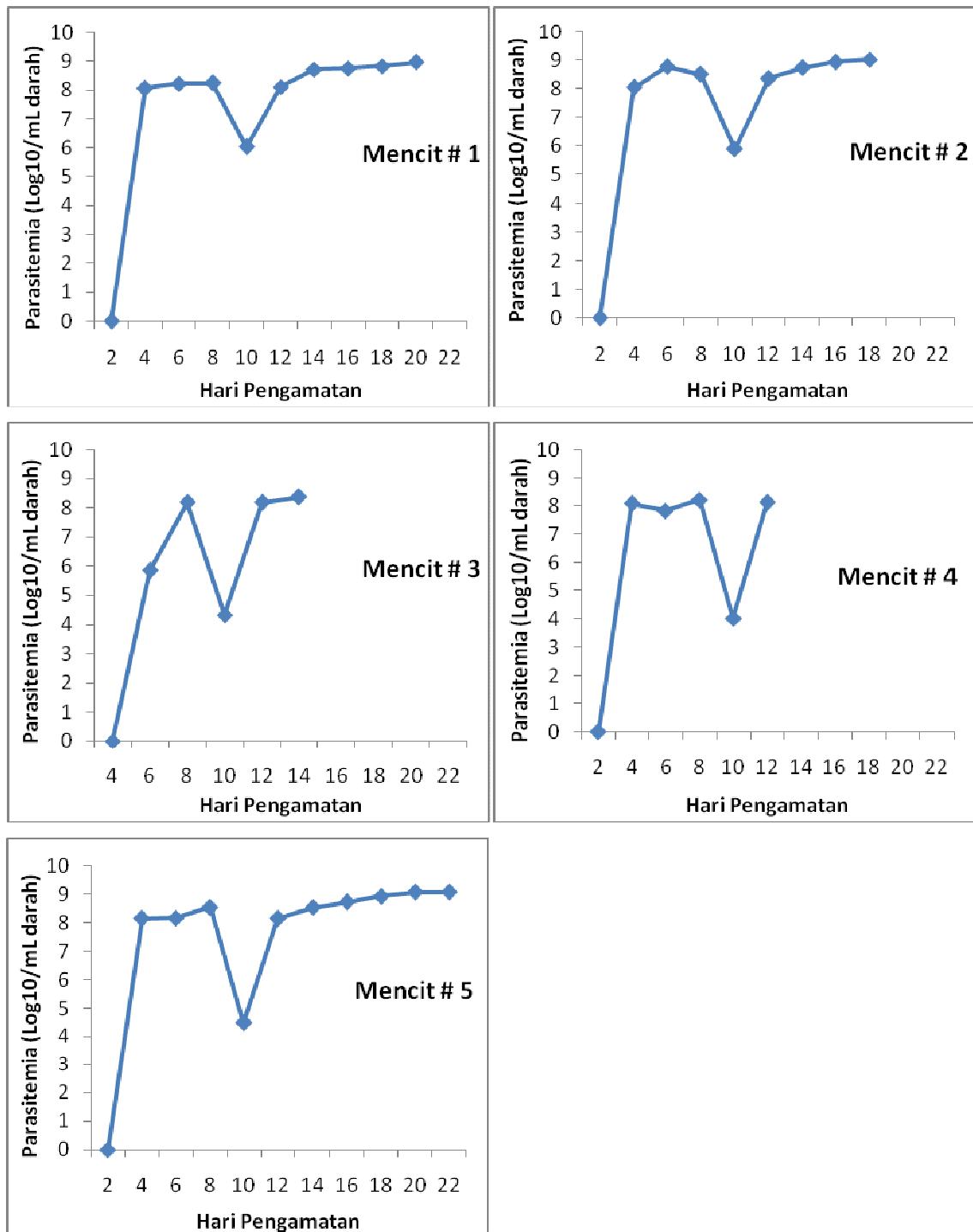
Pola parasitemia dan kematian pada mencit yang diinfeksi dengan *T. evansi* isolat Bangkalan (EJ1) menunjukkan pola yang seragam. Parasitemia dalam darah perifer meningkat tajam dalam kurun waktu 2 - 4 hari dan langsung diikuti dengan kematian (Gambar 2). Pola demikian juga terjadi pada mencit yang diinfeksi *T. evansi* isolat NT1 (Gambar 4), EJ2, CJ1 dan L. Dengan demikian isolat-isolat tersebut dikelompokkan dalam satu tipe yang memiliki pola serupa yaitu biotipe 1. Ciri khas biotipe 1 adalah peningkatan parasitemia secara tajam pada waktu singkat dengan konsentrasi parasit yang tinggi (10^7 - 10^8 /mL darah) dan umumnya mencit hanya bertahan dalam waktu 2 - 4 hari, karena langsung diikuti dengan kematian secara serentak (60 - 100%). Oleh karena lama hidup mencit yang singkat sejak pertama kali parasitemia terdeteksi, maka kelompok biotipe 1 tersebut sangat ganas pada mencit.

Pola parasitemia dan kematian pada mencit yang diinfeksi dengan *T. evansi* isolat Pemalang (CJ4) juga memperlihatkan pola yang seragam yang disebut sebagai biotipe 2. Parasitemia dalam darah perifer meningkat tajam pada 4 hpi namun tidak langsung diikuti dengan kematian mencit (Gambar 3).

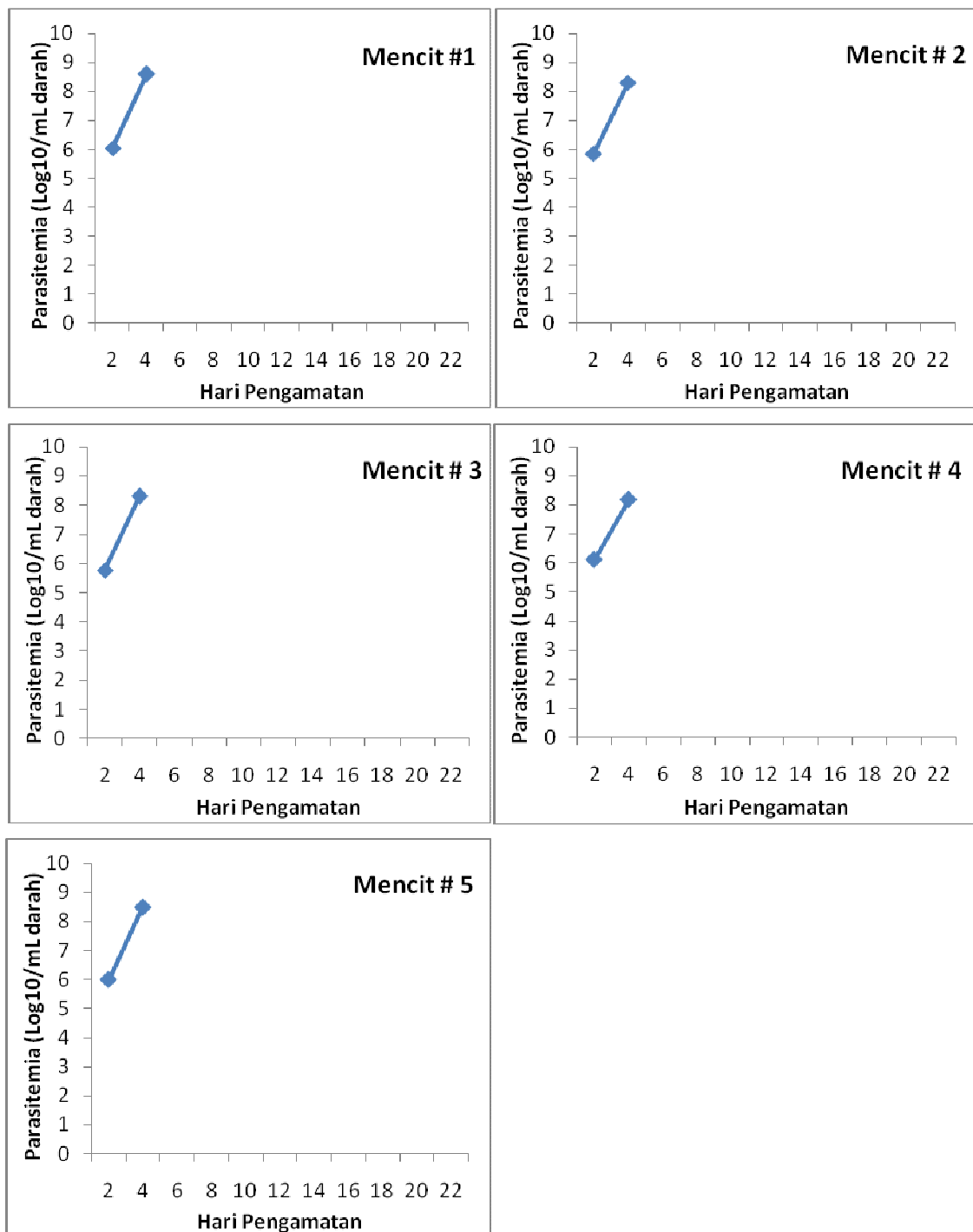
Konsentrasi parasit dalam darah berfluktuasi disekitar 10^7 - 10^8 /mL darah sebelum kemudian mengalami penurunan sangat tajam. Penurunan parasitemia yang sangat tajam (umumnya ≥ 2 log) terjadi pada 10 hpi (6 hari setelah periode prepaten). Pada percobaan sebelumnya di laboratorium kami (data tidak dipublikasikan), juga diketahui bahwa penurunan parasitemia yang tajam tersebut dapat terjadi pada 8 hpi - 12 hpi (sekitar 4 - 8 hari setelah periode prepaten). Selanjutnya, parasitemia kembali meningkat dengan konsentrasi tinggi (10^7 - 10^8 /mL darah). Pola parasitemia yang terjadi secara bergelombang “tinggi - rendah - tinggi” (meningkat tajam kemudian beberapa saat menurun tajam bahkan sampai hilang dari darah perifer dan kembali meningkat tajam) dapat terjadi sekali atau berulang kali dalam siklus biologi *T. evansi* dari biotipe 2 pada mencit. Pola tersebut dikenal sebagai “*undulating parasitaemia* (parasitemia undulan)” yang menjadi ciri khas kelompok biotipe 2. Parasitemia undulan juga merupakan bentuk tipikal dari *african trypanosomes* (Queiroz et al. 2000) atau *Salivarian trypanosomiasis* (De-Menezes et al. 2004). Parasitemia undulan pada isolat dari biotipe 2 umumnya terjadi sekali kemudian diikuti dengan parasitemia yang tetap tinggi sebelum diakhiri dengan kematian secara gradual mulai pada 14 hpi atau lebih.



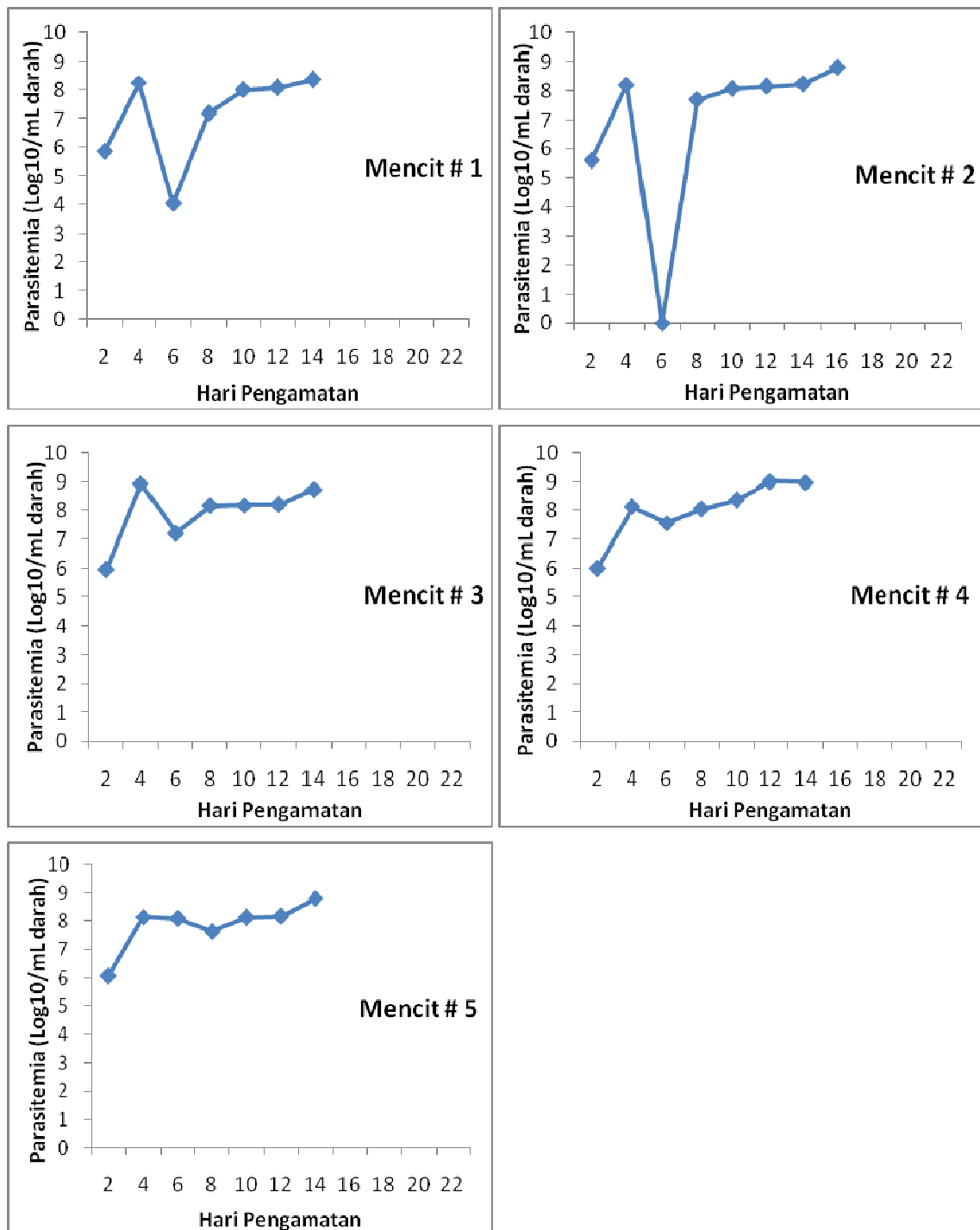
Gambar 2. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat EJ1 (10^4 parasit/ekor). Parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer pada 4 hpi dan diikuti kematian mencit pada 6-8 hpi. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali



Gambar 3. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat CJ4 (10^4 parasit/ekor). Parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer pada 4 hpi dan diikuti parasitemia undulan. kematian mencit pada 14-22 hpi. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali



Gambar 4. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat NT1 (10^4 parasit/ekor). Parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer pada 2 hpi dan diikuti kematian mencit pada 6 hpi. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali



Gambar 5. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat NT2 (10^4 parasit/ekor). Parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer pada 2 hpi. Mencit ke 1 - 3 terdapat pola parasitemia undulan diikuti kematian pada 16 - 20 hpi. Pada mencit ke 4 dan 5 tanpa parasitemia undulan dengan kematian mencit pada 16-18 hpi. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali

Dengan demikian, perbedaan utama antara isolat Bangkalan (EJ1) dengan isolat Pemalang (CJ4) terdapat pada pola parasitemia yang menggambarkan dinamika perkembangan parasit dalam darah (siklus biologi *T. evansi* dalam darah) dan pola kematian mencit. *T. evansi* isolat EJ1 (biotipe 1) ditandai dengan parasitemia tinggi dalam darah (10^7 - 10^8 /mL darah) dalam waktu singkat (hanya bertahan 2 - 4 hari dalam darah sejak pertama kali terdeteksi) disertai kematian mencit secara serentak. Kematian mencit DDY paling lama pada infeksi dengan *T. evansi* isolat Indonesia dari kelompok biotipe 1 terjadi pada 8 hpi (umumnya <40%) dengan periode prepaten sekitar 2 - 4 hari.

Sebaliknya pada mencit DDY yang diinfeksi *T. evansi* dari kelompok biotipe 2 (isolat dari Pemalang/CJ4), parasitemia yang tinggi dalam darah (10^7 - 10^8 /mL darah) dipertahankan selama beberapa hari kemudian diikuti penurunan tajam (bahkan sampai menghilang dari peredaran darah perifer). Setelah menurun tajam, kembali terjadi parasitemia yang tinggi dan dipertahankan selama beberapa hari sebelum hewan mengalami kematian. Kematian mencit paling awal pada infeksi *T. evansi* kelompok biotipe 2 dimulai pada 14 hpi, setelah itu kematian terjadi secara gradual sampai > 20 hpi. Pada beberapa kasus kematian paling awal dapat terjadi setelah 10 hpi dengan pola parasitemia undulan.

T. evansi isolat CJ4 umumnya memperlihatkan parasitemia undulan hanya sekali kemudian mencit mengalami kematian pada 16 - 20 hpi. Pola parasitemia pada CJ4 serupa dengan penelitian yang dilaporkan Queiroz et al. (2000), Queiroz et al. (2001), De-Menezes et al. (2004) dan Barkhuizen et al. (2007). Pada penelitian Barkhuizen et al. (2007), dilaporkan bahwa pada 20 hari pertama hanya terjadi satu gelombang parasitemia. Setelah 20 hpi, gelombang parasitemia masih terjadi sekali atau dua kali sebelum kemudian parasitemia dipertahankan tetap tinggi. Pada penelitian Barkhuizen et al. (2007) tersebut, rataan lama hidup mencit sangat lama yaitu $47 \pm 24,1$ hpi.

Kemungkinan isolat dari Indonesia (CJ4) lebih virulen dan memiliki populasi homolog dibanding isolat yang digunakan Barkhuizen et al. (2007). Hal tersebut terindikasi dari rataan lama hidup isolat CJ4 yaitu 17.2 ± 3.347 hpi ($\bar{X} + SD$) sedangkan isolat KETRI 2480 yang digunakan Barkhuizen et al. (2007) memiliki rataan lama hidup lebih lama dan heterogen populasinya, yaitu $47 \pm 24,1$ hpi ($\bar{X} + SD$). Laporan lain yang berbeda berasal dari penelitian Queiroz et al. yang menginfeksi *T. evansi* dari kuda, anjing dan koati pada tikus galur Wistar (*Wistar Rat*) justru melaporkan terjadinya parasitemia undulan secara berulang (dua kali gelombang) dalam waktu 20 hpi (Queiroz et al. 2000 ; Queiroz et al. 2001). Adapun penelitian De-Menezes et al. (2004) yang menggunakan

isolat Pantanal, Brazil juga melaporkan terjadi parasitemia undulan pada beberapa jenis mencit yang kemudian mengalami kematian pada 28 hpi.

Isolat *T. evansi* dari Sumba Timur dengan kode NT1 memiliki pola yang sama dengan isolat EJ1. Dengan demikian, kedua isolat tersebut merupakan kelompok populasi parasit (*T. evansi*) dari biotipe 1. Hal ini karena pada semua mencit menunjukkan keseragaman pola parasitemia dan kematian yang terkait dengannya. Adapun pada isolat *T. evansi* dari Sumba Timur dengan kode NT2 (Sumba 2), cenderung merupakan populasi campuran meskipun kematian mencit paling awal terjadi pada 16 hpi. Apabila ditinjau dari waktu kematian tercepat dan distribusi kematiannya, maka isolat NT2 seolah-olah serupa dengan isolat dari CJ4 (Tabel 2) sehingga dipembahasan awal dikelompokkan dalam satu grup yaitu grup C. Namun apabila diperhatikan pola kematian dan parasitemia yang terjadi didalam tubuh mencit, keduanya memiliki beberapa perbedaan mendasar.

Pada mencit nomor 1 - 3 yang diinfeksi dengan *T. evansi* dari isolat NT2 menunjukkan pola parasitemia dan kematian yang serupa dengan mencit yang mati karena infeksi *T. evansi* isolat CJ4 (Gambar 5). Hal tersebut disebabkan adanya persamaan ciri khas berupa parasitemia undulan dan kematian terjadi pada 16 dan 18 hpi. Adapun pada mencit nomor 4 dan 5 (Gambar 5), walaupun juga mati pada 16 hpi, namun tidak memiliki pola parasitemia undulan, tetapi parasitemia dipertahankan tetap tinggi ($\geq 10^7$ /mL darah) dalam waktu yang panjang (lebih dari satu minggu). De-Menezes et al. (2004) menggolongkan pola ini sebagai pola yang berbeda dengan biotipe 2 yang memiliki ciri parasitemia undulan. Ciri ini juga sangat berbeda dengan biotipe 1 yang umumnya berupa parasitemia tinggi secara mendadak diikuti dengan kematian.

Parasitemia undulan merupakan suatu pola regulasi biologi *T. evansi* dalam tubuh inang untuk dapat hidup lebih lama dengan mengatur kemampuan berkembang biak dan mempertahankan inang tetap hidup. Pola tersebut berkaitan dengan patogenesis penyakit yang melibatkan interaksi antara parasit dengan inang. Pola tersebut juga berkaitan dengan kemampuan *T. evansi* tersebut mengurangi kepadatan populasinya dalam darah saat jumlahnya sudah sangat tinggi dan kembali akan meningkat kembali setelahnya. Sebaliknya pada *T. evansi* biotipe 1, kemampuan tersebut tidak ditemukan, dan umumnya membunuh mencit dalam waktu singkat pada saat parasit berkembang biak dengan kepadatan tinggi dalam darah. Adapun pada mencit nomor 4 dan 5 dari isolat NT2 tersebut, parasitemia tetap dipertahankan tinggi ($\geq 10^7$ /mL darah) selama >6 hari tetapi mencit tidak mengalami kematian. Hal tersebut menunjukkan bahwa kemampuan galur *T. evansi* tersebut untuk membunuh mencit lebih rendah

dibanding biotipe 1 namun tidak menampilkan kemampuan regulasi biologis berupa parasitemia undulansebagaimanabiotipe 2.

Oleh karena itu, pola parasitemia tinggi ($\geq 10^7/\text{mL}$ darah) selama seminggu atau lebih digolongkan sebagai biotipe 3. Hal ini sejalan dengan pendapat De-Menezes et al. (2004) yang menggolongkannya sebagai pola patogenesis yang berbeda dengan biotipe 2. Berdasarkan hal tersebut, maka dapat diketahui bahwa isolat NT2 yang diisolasi dari seekor kerbau terdapat dua sub populasi *T. evansi*, yaitu sub populasi yang digolongkan kedalam biotipe 2 dan sub populasi biotipe 3. Biotipe 3 tidak hanya diketemukan pada sebagian populasi (sub populasi) dari *T. evansi* isolat NT2 semata, tetapi juga diketemukan pada isolat dari beberapa daerah lainnya yaitu grup A yang tidak masuk dalam biotipe 1, grup B dan grup C yang tidak masuk dalam biotipe 2. Diantara isolat tersebut contohnya adalah isolat SB2, isolat SC2, isolat NT4 dan NT5.

Pada *T. evansi* isolat SB2, ditemukan tiga biotipe yang berbeda pada percobaan menggunakan 10 ekor mencit. Biotipe 1 ditemukan pada 30% (3/10) mencit yang diinfeksi *T. evansi* SB2, yaitu mencit nomor 2, 5 dan 7 (Gambar 6). Adapun biotipe 2 juga ditemukan pada 30% (3/10) mencit yang diinfeksi *T. evansi* SB2, yaitu mencit nomor 1, 4 dan 8 (Gambar 6). Sebaliknya, biotipe 3 ditemukan pada 40% (4/10) mencit yang diinfeksi *T. evansi* SB2, yaitu mencit nomor 3, 6, 9 dan 10 (Gambar 6). Pola-pola tersebut bersesuaian dengan biotipe 1 dari isolat EJ1 dan yang serupa dengannya ataupun biotipe 2 dari isolat CJ4. Adapun pola dari biotipe 3 sesuai dengan sub populasi *T. evansi* dari isolat NT2. Demikian pula halnya *T. evansi* isolat SC2 juga serupa dengan isolat SB2 (Gambar 7). Biotipe 1 ditemukan pada 40% (2/5) mencit yang diinfeksi *T. evansi* SC2, yaitu mencit nomor 4 dan 5 (Gambar 7). Adapun biotipe 2 juga ditemukan pada 40% (2/5) mencit yang diinfeksi *T. evansi* SC2 (mencit nomor 1 dan 2), sedangkan biotipe 3 ditemukan pada 20% (1/5) mencit yaitu mencit nomor 3 (Gambar 7).

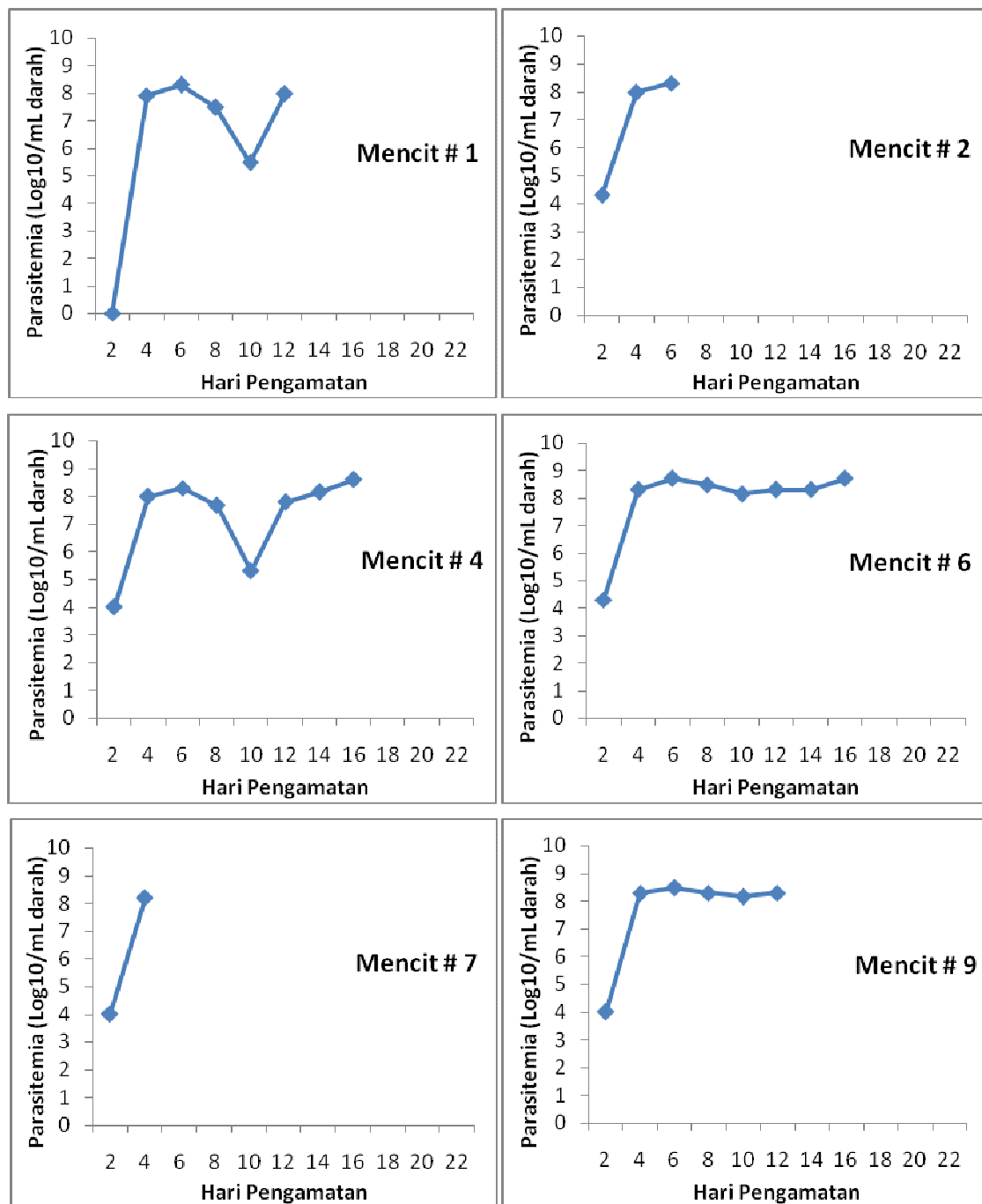
Walaupun memiliki tiga biotipe yang berbeda dalam satu isolat *T. evansi*, namun proporsinya berbeda antara isolat SB2 dengan isolat SC2. Hal demikian menyebabkan nilai rata-rata lama hidup (*survival time*) keduanya berbeda. Pada isolat SB2, lama hidup mencit yang diinfeksi adalah 10,6 hpi sedangkan lama hidup mencit yang diinfeksi isolat SC2 adalah 9,2 hpi (Tabel 2). Proporsi sub populasi biotipe 2 dan 3 pada isolat dari SB2 lebih dominan dibanding biotipe 1 (7 : 3) sehingga cenderung menyebabkan nilai rata-rata lama hidup mencit lebih lama. Sebaliknya pada isolat SC2, memiliki proporsi sub populasi biotipe 1 dan 3 hampir sama dengan biotipe 2 (6 : 4) yang menyebabkan nilai rata-rata lama hidupnya lebih singkat dibanding isolat SB2. Apabila dibandingkan dengan isolat EJ1 (rata-rata lama hidup mencit adalah 4,4 hpi) yang memiliki

populasi homogen (100% biotipe 1), nilai rata-rata lama hidup isolat SC2 tetap lebih panjang.

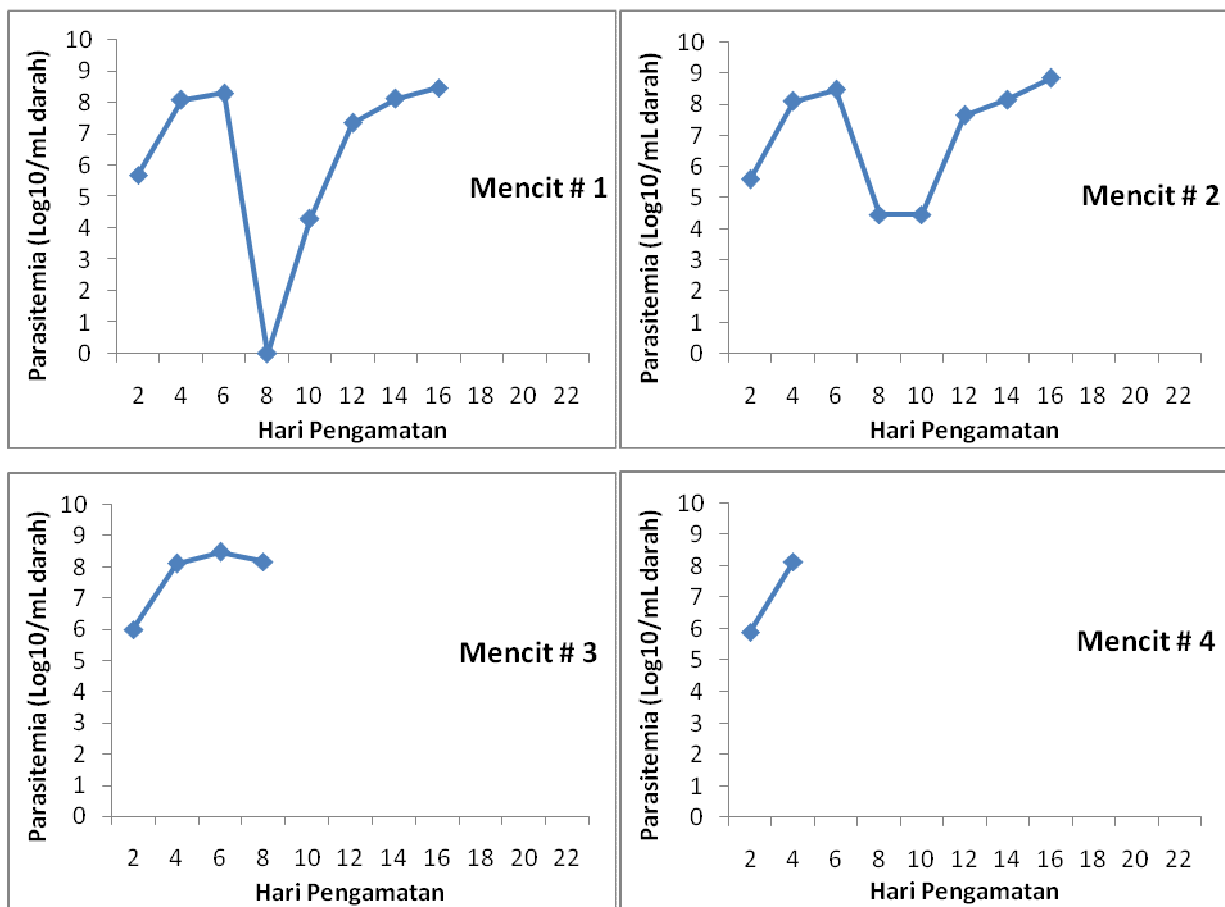
Demikian pula halnya dengan dua isolat *T. evansi* dari Sumba Timur lainnya (NT4 dan NT5), masing-masing juga memiliki sub populasi dengan biotipe yang berbeda. Pada isolat NT4 terdiri atas 2 sub populasi yaitu 60% (3/5) biotipe 1 dan 40% (2/5) biotipe 3 (Gambar 8). Konsekuensinya akan menyebabkan nilai rata-rata lama hidup yang teramat menjadi lebih singkat dibanding isolat dari SC2 maupun SB2. Adapun isolat NT5, juga terdiri atas 2 sub populasi, 20% (1/5) biotipe 1 dan 80% (4/5) biotipe 3 (Gambar 9). Hal tersebut menyebabkan lama hidupnya lebih lama dibandingkan isolat NT4 maupun isolat SC2.

Berdasarkan pola parasitemia dan kematian tersebut, dapat diketahui adanya tiga pola yaitu, biotipe 1, biotipe 2 dan biotipe 3. Biotipe tersebut diperlihatkan oleh sub populasi dalam suatu isolat *T. evansi*. Keberadaan sub populasi yang berbeda berdasarkan biotipe dan ditemukan bercampur dalam satu isolat kemungkinan menunjukkan adanya infeksi campuran (*mixed infection*) dari galur *T. evansi* yang berbeda patogenitasnya. Konsekuensinya, hal tersebut menunjukkan adanya perbedaan virulensi yang berkaitan dengan galur *T. evansi* yang berbeda tipologinya. Susunan virulensi hipotetik dimulai dari yang paling patogenik berdasarkan pola parasitemia dan kematian mencit adalah biotipe 1 > biotipe 3 > biotipe 2. Dengan demikian klasifikasi berdasarkan biotipe tersebut lebih terarah dibandingkan pengelompokan sebelumnya.

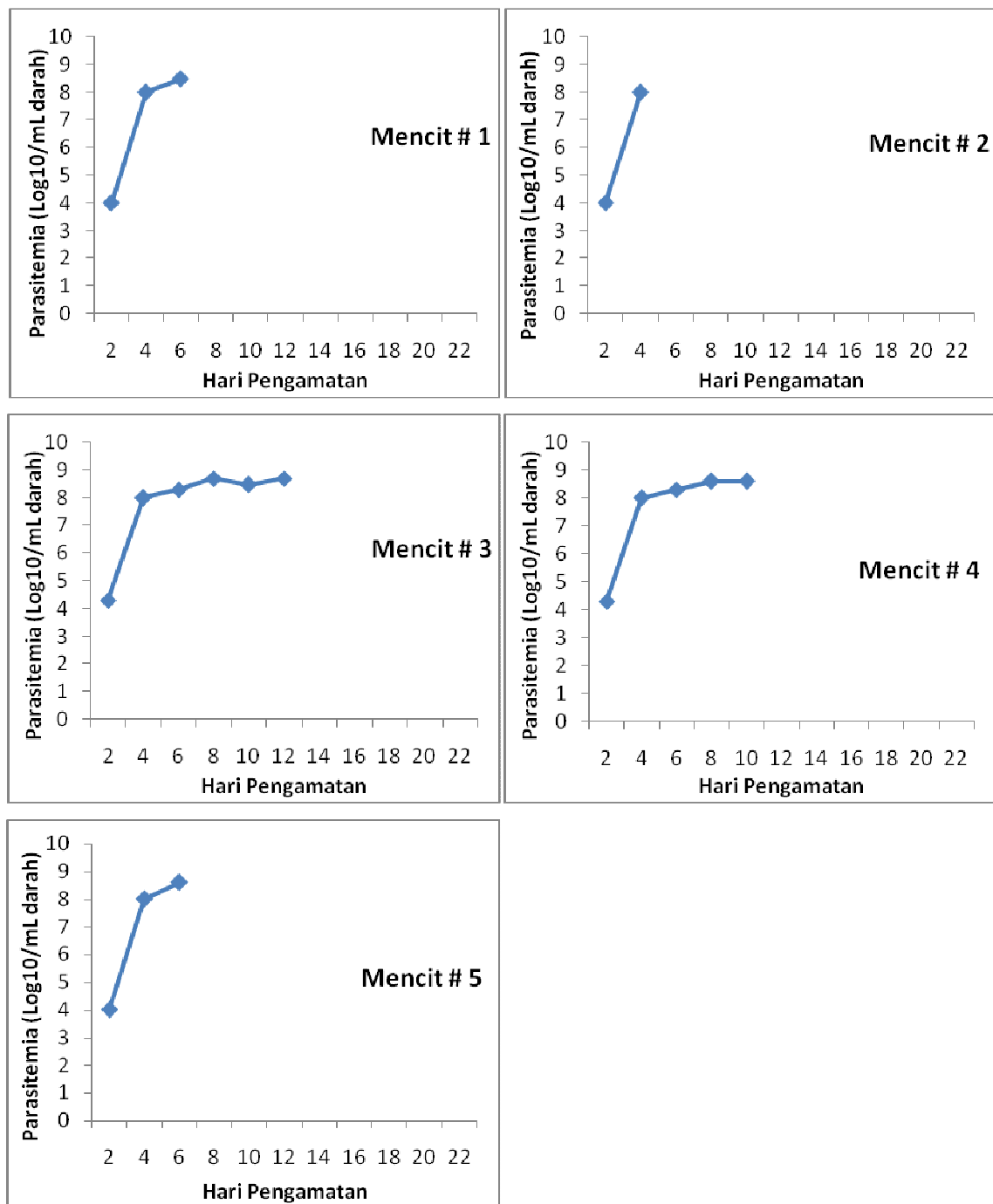
Disisi lain, menetapkan isolat *T. evansi* (misalnya isolat SC2, NT4 dan NT5 – lihat Tabel 2) memiliki derajat virulensi moderat berdasarkan kriteria yang dijelaskan Mekata et al. (2013) tidak tepat karena empat alasan utama. Pertama, klasifikasi tersebut bermakna bahwa populasi *T. evansi* (misalnya isolat SC2 atau NT4) memiliki virulensi moderat sementara pengamatan pola parasitemia dan kematian menunjukkan adanya dua atau lebih sub populasi yang berbeda dalam isolat tersebut. Kedua, sub populasi tersebut memiliki biotipe yang berbeda dalam kaitannya dengan pola kematian dan parasitemia. Pola yang berbeda tersebut menunjukkan adanya perbedaan regulasi biologis dalam siklus hidup parasit tersebut yang terkait dengan interaksi host - parasit. Ketiga, penetapan virulensi moderat pada isolat *T. evansi* (misalnya SC2 atau NT4) mengabaikan bukti adanya campuran biotipe yang terdapat dalam isolat tersebut, sehingga tidak dibedakan apakah campuran biotipe 1 dan 2 atau biotipe 2 dan 3 atau bahkan lainnya. Kondisi tersebut menyebabkan informasi adanya infeksi campuran akan terabaikan dengan adanya klasifikasi “virulensi moderat”. Keempat, penetapan klasifikasi derajat virulensi berdasarkan kriteria matematis sebagaimana dilakukan Mekata et al. (2013)



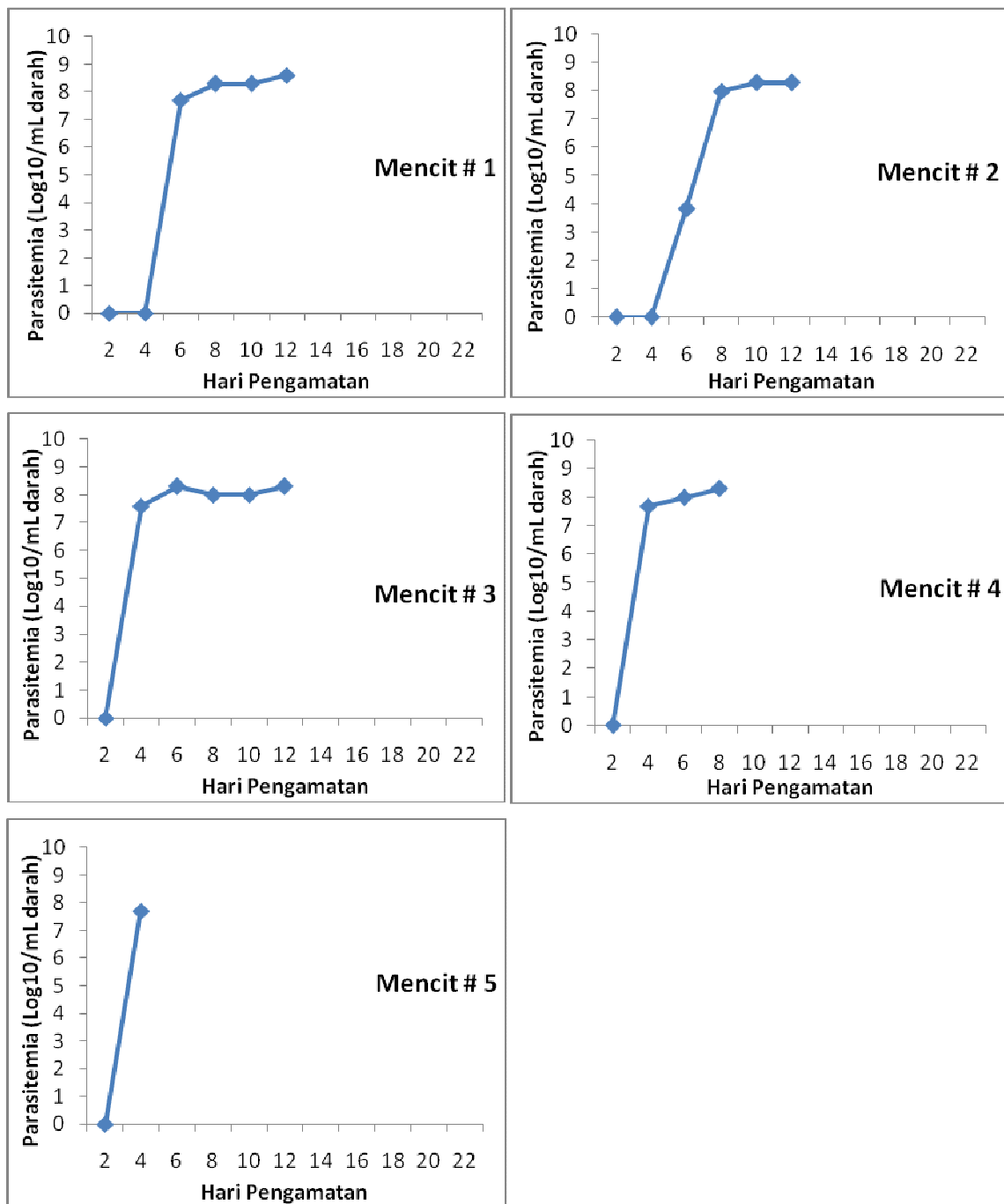
Gambar 6. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat SB2 (10^4 parasit/ekor). Parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer pada 2 hpi. Mencit ke -1 dan 4 terdapat pola parasitemia undulan diikuti kematian pada 14-20 hpi. Pada mencit ke - 6 dan 9 tanpa parasitemia undulan dengan kematian mencit pada 14-18 hpi. Pada mencit ke - 2 dan 7 mengalami kematian 6-8 hpi. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali



Gambar 7. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat SC2 (10^4 parasit/ekor). Parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer pada 2 hpi. Mencit ke- 1 dan 2 terdapat pola parasitemia undulan diikuti kematian pada 18 hpi. Pada mencit ke - 3 dan 4 tanpa parasitemia undulan dengan kematian mencit pada 10 hpi (mencit 3) dan 6 hpi (mencit ke 4). Pengamatan dilakukan setia 2 hari sekali



Gambar 8. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat NT4 (10^4 parasit/ekor). Parasitemia pertama kali terdeteksi dalam darah perifer pada 2 hpi. Mencit ke - 1, 2 dan 5 mengalami kematian pada 6-8 hpi. Pada mencit ke 3 dan 4 tanpa parasitemia undulan dengan kematian mencit pada 14 hpi. Pengamatan dilakukan setiap 2 hari sekali



Gambar 9. Pola parasitemia dan kematian mencit DDY yang diinfeksi *Trypanosoma evansi* isolat NT5 (10^4 parasit/ekor). Pada mencit ke 1 - 4 terdapat pola parasitemia undulan dengan kematian pada 10 - 14 hpi. Pada mencit ke-5 mengalami kematian pada 6 hpi. Pengamatan dilakukan setia 2 hari sekali

mengabaikan faktor esensial yang berkaitan dengan patogenitas parasit pada hewan coba, yaitu interaksi host-parasit yang akan mempengaruhi patogenesis, yaitu proses berjalannya suatu penyakit hingga muncul gejala klinis ataupun kematian. Oleh karena itu, penetapan derajat virulensi harus mengacu pada kriteria biologis bukan matematis.

Berdasarkan pertimbangan tersebut, maka penetapan virulensi suatu isolat *T. evansi* mengikuti metode yang dideskripsikan Mekata et al. (2013) dipandang tidak tepat. Sebaliknya, pengelompokan virulensi berdasarkan perbedaan patogenesis sebagaimana dideskripsikan De-Menezes et al. (2004) yang ditunjukkan dengan perbedaan biotipe lebih terarah dan tepat. Penetapan klasifikasi virulensi isolat NT4 (dan juga lainnya sebagaimana dicantumkan dalam Tabel 2) dengan ketetapan “moderat” sangat berbeda dengan penetapan bahwa didalam isolat NT4 terdapat sub populasi parasit dengan virulensi yang berbeda berdasar aspek patogenesis yang terdiri dari biotipe 1 dan biotipe 3. Demikian pula dengan isolat lainnya. Penetapan virulensi pada tingkat isolat hanya dapat dibenarkan jika populasi parasit dalam isolat tersebut homogen (seragam), misalnya pada isolat EJ1 maupun CJ4. Sebaliknya jika didalam isolat tersebut populasinya tidak seragam (heterogen), maka penetapan virulensinya harus diperinci berdasarkan biotipe dari sub populasi *T. evansi* dalam isolat tersebut. Apabila kriteria dari Mekata et al. (2013) diterapkan maka dari ke 19 isolat *T. evansi* tersebut akan tersebar dalam derajat virulensi tinggi, moderat dan rendah. Namun berdasarkan rata-rata lama hidup mencit (*survival time*) yang telah diinfeksi *T. evansi* isolat Indonesia, seluruhnya justru menunjukkan kecenderungan lebih virulen dibanding isolat yang digunakan Barkhuizen et al. (2007) maupun Queiroz et al. (2000). Dengan demikian penetapan derajat virulensi dengan cara demikian menjadi bias dan inkonsisten.

KESIMPULAN

Berdasarkan pola parasitemia dan kemampuan membunuh mencit DDY disimpulkan bahwa ke-19 isolat *T. evansi* dari Indonesia dapat dikelompokkan kedalam tiga biotipe. Biotipe 1 memiliki kemampuan membunuh mencit paling cepat dan meningkat secara tajam dalam waktu singkat. Adapun biotipe 2 dan 3 memiliki kemampuan membunuh mencit lebih lama. Biotipe 2 ditandai dengan adanya parasitemia undulan, sedangkan biotipe 3 memiliki ciri mempertahankan parasitemia yang tinggi dalam waktu lama. Adanya biotipe yang berbeda dalam satu isolat *T. evansi* kemungkinan mengindikasikan adanya infeksi campuran (*mixed infection*) dalam tubuh hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- Baral TN, De Baetselier P, Brombacher F, Magez S. 2007. Control of *Trypanosoma evansi* infection is IgM mediated and does not require a type I inflammatory response. J Infect Dis. 195:1513-1520.
- Barkhuizen MS, Magez, Atkinson RA, Brombacher F. 2007. Interleukin-12p70-Dependent Interferon- γ production is crucial for resistance in African Trypanosomiasis. J Infect Dis. 196:1253-1260.
- De-Menezes VT, Queiroz AO, Gomes MAM, MarqueSand MAP, Jansen AM. 2004. *Trypanosoma evansi* inbred and Swiss-Webster mice: distinct aspects of pathogenesis. Parasitol Res. 94:193-200.
- Dirkeswan. 2012. Pedoman pengendalian dan pemberantasan penyakit Trypanosomiasis (Surra). Direktorat Kesehatan Hewan, Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan Kementerian Pertanian.
- Gillingwater K, Büscher P, Brun R. 2007. Establishment of a panel of reference *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma equiperdum* strains for drug screening. Vet Par. 148:114-121.
- Mekata H, Konnai S, Mingala CN, Abes NS, Gutierrez CA, Dargantes AP, Witola WH, Inoue N, Onuma MS, Ohashi K. 2013. Isolation, cloning, and pathologic analysis of *Trypanosoma evansi* field isolates. Parasitol Res. DOI 10.1007/s00436-013-3297-3
- Perrone-carmona TM, Garrizzo J, Roschman-González A, Tejero F, Escalante A, Aso PM. 2006. Susceptibility of different mouse strains to experimental infection with a Venezuelan isolate of *Trypanosoma evansi*. J Protozool Res. 16:1-8.
- Queiroz AO, Cabello PH, Jansen AM. 2000. Biological and biochemical characterization of isolates of *Trypanosoma evansi* from Pantanal of Matogrosso - Brazil. Vet Par. 92:107-118.
- Queiroz AO, Legey AP, Xavier SCC, Jansen AM. 2001. Specific antibody levels and antigenic recognition of wistar rats inoculated with distinct isolates of *Trypanosoma evansi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96:965-972.
- Reid SA, Husein A. 1998. Variation in the susceptibility of 6 strains of mouse to infection with *Trypanosoma evansi*. J Protozool Res. 8:201-203.
- Smuts CM. 2009. Development of tools to improve the detection of *Trypanosoma evansi* in Australia (PhD Thesis). [Perth (Australia)]. School of Veterinary and Biomedical Sciences, Murdoch University.
- Verdillo JCM, Lazaro JV, Abes NS, Mingala CN. 2012. Comparative virulence of three *Trypanosoma evansi* isolates from water buffaloes in the Philippines. Exp Par. 130:130-134.