

DETECCIÓN DIFERENCIAL DE *TRYPANOSOMA EVANSI* Y *TRYPANOSOMA VIVAX* MEDIANTE UN ENSAYO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Differential Detection of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* Through a Polymerase Chain Reaction Assay

Herakles A. García ^{*,1}, Hilda A. Pérez ^{**}, Luis B. Luis ^{***} y
Alexis Mendoza-León ^{***}

^{*}Laboratorio de Hemoparásitos, Cátedra de Parasitología-Departamento de Patología Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias-Universidad Central de Venezuela (FCV-UCV), Apartado 4563. Maracay 2101A. Estado Aragua-Venezuela.

^{**}Laboratorio de Inmunoparasitología, Centro de Microbiología. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas-Venezuela.

^{***}Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Correo-E: herakles@lycos.com

Recibido: 02/04/04 - Aprobado: 03/12/04

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue optimizar un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para efectuar el diagnóstico diferencial de *Trypanosoma evansi* y *Trypanosoma vivax*, usando cebadores previamente descritos: 21-mer/22-mer e ILO1264/ILO1265. La especificidad se evaluó efectuando pruebas preliminares sobre muestras de ADN purificado de diversas especies de parásitos y sobre mezclas de éstas. La sensibilidad se valoró empleando diluciones de ADN de aislados de referencia de *T. evansi* y *T. vivax* y concentraciones variables de cebadores. El ensayo optimizado mostró una sensibilidad de 10 pg de ADN, con especificidad para el Subgénero *Trypanozoon* (cebadores 21-mer/22-mer)

ABSTRACT

The purpose of this study was to standardize a polymerase chain reaction (PCR) assay in order to reach a differential diagnosis of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* using previously described primers: 21-mer/22-mer and ILO1264/ILO1265. Assay specificity was evaluated through preliminary test on both purified DNA from different parasite species and on their mixtures. Assay sensitivity was tested using decreasing DNA concentration of *T. evansi* and *T. vivax* strain reference and different primer concentrations. The optimized PCR assay showed a sensitivity of 10 pg of DNA with specificity to subgenus *Trypanozoon* (primers 21-mer/22-mer) and an absolute specificity for *T.*

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (Corresponding Author).

y especificidad absoluta para *T. vivax* (cebadores ILO1264/ILO1265). Ambos grupos de cebadores mostraron potencialidad para detectar infecciones mixtas *T. evansi/T. vivax*. Un análisis de hibridación sobre el patrón de cariotipo de diversos *Kinetoplastida*, usando la sonda Te-ADN, mostró su carácter repetitivo y la distribución de su secuencia en diferentes cromosomas de *T. evansi* TE0. La PCR fue evaluada como herramienta diagnóstica de la presencia de tripanosomas en muestras sanguíneas de animales con infecciones experimentales, demostrando alta sensibilidad al detectar positividad hasta 72 horas antes que lo hicieran los métodos parasitológicos. Este ensayo también fue evaluado sobre muestras sanguíneas de búfalos de agua con infecciones naturales, mostrando alta sensibilidad y especificidad al detectar 9/86 muestras como positivas a *T. vivax*, revelando una tasa de infección activa de 10,47%; valor tres veces superior a los resultados de la evaluación microscópica de frotis teñidos (3,49%) y casi dos veces superior (6,98%) a la técnica parasitológica de microcentrifugación capilar. En ninguna de las muestras de búfalos evaluadas se detectó *T. evansi*.

(Palabras clave: PCR, tripanosomiasis, búfalo de agua, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, diagnóstico)

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma vivax y *Trypanosoma evansi*, protozoarios hemotrópicos pertenecientes al Orden *Kinetoplastida*, son los agentes causales de la tripanosomiasis animal en Venezuela; se reporta que la enfermedad en bovinos y otros ungulados se debe a la infección por *T. vivax*; mientras que *T. evansi* está involucrado como patógeno de **équidos**. En América tropical, en

vivax (ILO1264/ILO1265). Both primer sets showed a high capability to detect mixed infections by *T. evansi/T. vivax*. A hybridization assay on molecular karyotypes of *Kinetoplastida* parasites, using the Te-DNA probe, showed both a high sequence copying and a sequence distribution in different chromosomes of *T. evansi* stock TE0. PCR assay was used as a tool to evaluate the presence of trypanosomes in blood samples of experimentally infected animals, showing high sensitivity as it detected positive samples 72 hours before than parasitological methods. This assay was also run on blood samples of naturally infected water buffaloes showing both high sensitivity and specificity as it detected 9 out of 86 samples as positive for *T. vivax*. This reveals an active infection range of 10.47%. A value which is three times higher than the detection range by microscopic evaluation of stained blood smears (3.49%) and about twice as high as the microhematocrit centrifugation technique (6.98%). *T. evansi* was not found in any of the buffalo blood samples tested.

(Key words: PCR, trypanosomiasis, water buffaloes, *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, diagnosis)

ausencia del vector natural (*Glossina* spp.), ambas especies se transmiten principalmente de forma mecánica, mediante dípteros hematófagos (*Tabanus* spp., *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*), en un ciclo donde existe una importante participación de reservorios como chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*), búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y diferentes especies de la Familia *Cervidae* (venados). Se ha demostrado la participación

del *Desmodus rotundus* en la transmisión de *T. evansi*, pero en nuestro país se desconoce la importancia epidemiológica de ese proceso. La enfermedad presenta un notable impacto económico debido a su curso crónico y a los efectos adversos sobre el hospedador, los cuales incluyen anemia severa, pérdida de condición corporal, infertilidad, aborto y muerte. Los animales que sobreviven a la infección mantienen bajos niveles de parasitemia y se convierten en portadores crónicos (Hoare, 1965; Rivera, 1996; Contreras *et al.*, 2001).

El diagnóstico de infección activa por los tripanosomas antes señalados se efectúa a través de la demostración del parásito en la sangre o tejidos fluidos de animales infectados, para lo cual tradicionalmente se emplean métodos parasitológicos como frotis teñidos, técnicas de concentración por centrifugación (TMC) e inoculación de animales susceptibles. Desafortunadamente estos procedimientos presentan limitaciones para estudios epidemiológicos y de sensibilidad, debido a los bajos niveles de parasitemia y a su comportamiento ondulante, particularmente en casos de infecciones agudas o crónicas. Esta situación genera una alta proporción de resultados falsos negativos. Por otro lado, la diferenciación morfológica entre especies requiere de personal experimentado debido a que el limitado rango de características comparativas hace a los miembros de este género morfológicamente indistinguibles, a pesar de existir marcadas diferencias epidemiológicas y fisiopatológicas (McManus y Bowles, 1996).

El desarrollo de la biología molecular ha hecho de la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de ADN una herramienta invaluable en el diagnóstico de agentes patógenos. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha sido adaptada al diagnóstico de diferentes

tripanosomatídeos, demostrándose su versatilidad en la detección precoz de infecciones y en la identificación específica de parásitos en hospederos, reservorios y vectores. La alta sensibilidad en la detección de *T. evansi* y *T. vivax* permitiría la instauración oportuna del tratamiento y una mejor estimación de la presencia y distribución de estos parásitos; mientras que la identificación específica posee una marcada relevancia debido a las diferencias en la susceptibilidad a los quimioterapéuticos y al diferente comportamiento epidemiológico de estas dos especies (Nantulya, 1990). En éste trabajo se describen las condiciones de un ensayo de PCR para la detección diferencial, sensible y específica de *T. evansi* y *T. vivax*, empleando oligonucleótidos que hibridan en secuencias repetitivas de ADN nuclear. Además, se presentan los resultados de la aplicación del ensayo optimizado en la detección de estos protozoarios en muestras sanguíneas de animales, mostrando la potencialidad del uso de técnicas moleculares en el diagnóstico de la tripanosomiasis animal y en la resolución de problemas de infección en unidades de producción pecuaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

ADN de parásitos

El ensayo de PCR fue optimizado mediante la ejecución de reacciones en las cuales se empleó ADN purificado de las siguientes especies de parásitos: *Trypanosoma brucei brucei* (cepa 345), donado por el Dr. Frédéric Bringaud del Laboratoire de Parasitologie Moléculaire de la Universidad de Bordeaux, Francia; *Leishmania donovani*, *Leptomonas* sp., *Endotrypanum* sp., *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Crithidia fasciculata*, *Saccharomyces cerevisiae*, donados por el Dr. Alexis Mendoza-León del Laborato-

rio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental-Universidad Central de Venezuela. Se usó como referencia ADN de las especies *T. evansi* (cepa TE0) y *T. vivax* (cepa ILO2160), donados por la Dra. Hilda Pérez del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)-Venezuela y el Dr. Alberto Dávila del Instituto FIOCRUZ-Brasil, respectivamente.

Ensayos de PCR

Se efectuaron amplificaciones preliminares usando como patrón ADN purificado de diversas especies de parásitos. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L, en un termociclador PTC-200 (MJ Research®) en tubos eppendorf de 500 μ L. Cada tubo recibió 22 μ L de PCR Supermix Gibco BRL® (22 mM Tris HCl pH 8,4; 55 mM KCl; 1,65 mM MgCl₂; 0,22 mM dGTP; 0,22 mM dATP; 0,22 mM dTTP; 0,22 mM dCTP; 22 Unidades de *Taq* ADN polimerasa recombinante/ml), 1 μ L de cada primer y 1 μ L del ADN patrón. Las reacciones se cubrieron con 25 μ L de aceite mineral (Sigma Ch. CO. St. Louis MO USA®) y se sometieron a 95° C/5min de preincubación siguiendo con 40 ciclos de reacción con 94° C/60 seg. de desnaturalización, 55° C/90 seg para el anillamiento y 72° C/60 seg. en la fase de polimerización, la cual se extendió por tres minutos en el último ciclo. Se evaluaron diferentes concentraciones de cebadores y de ADN de las especies de referencia *T. evansi* (TE0) y *T. vivax* (ILO2160), a fin de determinar la sensibilidad del ensayo. La especificidad se evaluó sobre mezclas de ADN de estas dos especies y de los diversos organismos antes citados.

Oligonucleótidos iniciadores: Cebadores

Se emplearon cebadores previamente descritos por Wuyts *et al.* (1995) y Masake *et al.* (1997) en la amplificación de secuencias repetitivas de ADN genómico de *T. evansi* y *T. vivax*, respectivamente. Los cebadores 21-mer (5'-TGC AGA CGA CCT GAC GCT ACT-3') y 22-mer (5'-CTC CTAGAA GCT TCG GTG TCC T-3') amplifican 227 pares de bases (pb), son reportados con especificidad de Subgénero (*Trypanozoon*). El tamaño del producto amplificado con los cebadores ILO1264 (5'-CAG CTC GGC GAA GGC CAC-3') e ILO1265 (5'-TCG CTA CCA CAG TCG CAA TC-3') es de 400 pb, empleados para el diagnóstico específico de *T. vivax*.

Detección de productos de PCR

Una alícuota de 10 μ l de los productos de PCR fue mezclada con buffer de carga (Glicerol 50%, 1mM EDTA, 0,4% Azul de bromofenol, 0,4% Xilencianol) y sometida a electrofóresis en gel de agarosa al 1,5% en TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido Bórico, 2 mM EDTA). El gel fue teñido por inmersión en bromuro de etidio (0,5 μ g/ml) y visualizado bajo luz U.V., procediendo a efectuar un registro fotográfico del mismo.

Análisis de Cariotipo

Se llevó a cabo un fraccionamiento de "cromosomas" mediante electrofóresis en campo pulsado en un sistema CHEF Mapper System, Bio-Rad®, para los organismos *Trypanosoma cruzi* (zimodemos 1 y 2), *Trypanosoma evansi* (cepa TE0), *Leishmania mexicana*, *Leishmania donovani*, *Leptomonas* sp., *Herpetomonas* y *Crithidia fasciculata*. En la preparación del

ADN cromosómico, un total de 5×10^8 parásitos de las especies antes citadas, contenidos en $500 \mu\text{L}$ de buffer Net-100 (0,1 M NaCl; 0,1 M EDTA pH 8,0; 0,01 M Tris-HCl, pH 8,0) fueron mezclados con igual volumen de agarosa de bajo punto de fusión (LE Agarosa, Beckman®) al 1,5% en buffer TBE 0,5% (90 mM Tris-HCl, pH 8,2; 90 mM ácido bórico; 2,5 mM EDTA) y colocados en moldes. Los parásitos contenidos en los bloques de agarosa resultantes fueron sometidos a un proceso de digestión con proteinasa K (2 mg/ml) en solución de lisis (0,5 M EDTA, pH 9,1; 1% sarcosil) a 55°C por 48 h. Rebanadas de los bloques fueron cargadas en un gel de agarosa al 1% en TBE 0,5% y sometidos a electroforesis en el mismo buffer. La electroforesis se efectuó con frecuencias de pulsos ascendentes de 20, 40 y 60 segundos, en tres bloques de 8 h cada uno; se empleó un voltaje de 6 V/cm y temperatura constante de 14°C . Condiciones similares a las empleadas por Eresh *et al.* (1993) para la separación de bandas cromosómicas con una máxima resolución en la región entre 200 kilo pares de bases (kpb) y 800 kpb. Se empleó como marcador de peso molecular ADN de *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad®). El gel fue teñido en bromuro de etidio ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y una vez verificadas las bandas de ADN cromosómico bajo luz U.V., se procedió a transferirlas en forma bidireccional a membranas de nylon Hybond N+, (Amersham®) según lo descrito por Smith y Summer (1980), hibridando luego con una Sonda marcada utilizando [^{32}P]dCTP, para lo cual se empleó el kit Megaprimer ADN labelling system, Amersham®. La sonda se denominó Te-ADN y fue preparada a partir del producto de amplificación de *T. evansi*, el cual fue extraído de geles preparativos y purificado mediante el kit Concert™ Matrix Gel Extraction System, Life

Technologies Gibco BRL®, siguiendo lo establecido por los suplidores.

Condiciones de hibridación

La hibridación se efectuó según la metodología descrita por Kukla *et al.* (1987), empleando condiciones de mediana astringencia (2X SSC, 2% SDS, 2X solución Denhardt, $100 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ esperma de salmón, 67°C ; donde 2X SSC: 0,3M NaCl, 0,03M citrato de sodio; SDS: sodio dodecil sulfato). Luego de la hibridación, los filtros se lavaron a mediana astringencia durante 1h a 67°C en 2X SSC/2% SDS, con un mínimo de tres cambios de buffer, para finalmente ser expuestos a una placa de rayos-x en un sistema con enaltecedor a -80°C .

PCR sobre muestras sanguíneas de animales con inoculación experimental y de búfalos de agua en condiciones naturales de explotación

Con la finalidad de evaluar la capacidad de detección de ADN de *T. evansi* y *T. vivax* en muestras recolectadas a partir de animales infectados por estas especies, se inocularon ratones machos adultos CD1 vía intraperitoneal con 1×10^3 parásitos del aislado *T. evansi* TE0, procediendo a evaluar diariamente el nivel de parasitemia por microcentrifugación capilar (Woo, 1969). Al evidenciar positividad parasitológica los animales fueron sangrados recolectando las muestras en tubos con citrato de sodio (0,129M) y almacenándolas a 4°C bajo protección de la luz solar directa. Análogamente se efectuó inoculación intravenosa de un ovino de seis meses de edad, parasitológicamente negativo a *Trypanosoma* sp., *Babesia* sp. y *Anaplasma* sp., con 1×10^5 parásitos del aislado *T. vivax* ILO2160. Al momento de evidenciar positividad parasitológica se recolectó y almacenó una muestra de sangre de la

forma antes descrita. Paralelamente, se procedió a recolectar aleatoriamente 86 muestras sanguíneas de búfalos ubicados en distintas áreas geográficas del estado Guárico, Venezuela; donde *T. evansi* y *T. vivax* se presentan con alta prevalencia serológica según reportes de Toro *et al.* (1980); el sangrado se realizó por punción de la vena yugular mediante el uso de Venoject[®], en tubos con citrato de sodio (0,129M), almacenando del modo descrito. El mantenimiento de los animales de experimentación y el proceso de recolección de muestras se efectuaron evitando cualquier sufrimiento en los animales, según protocolos internacionales establecidos para el manejo de este tipo de unidades experimentales.

El ensayo de PCR optimizado en términos de su sensibilidad y especificidad fue usado para la detección de tripanosomas en las muestras sanguíneas recolectadas, siguiendo la metodología descrita por Desquesnes y Tresse (1996). Brevemente, luego de una centrifugación inicial (430 g/10 min) se recolectaron 500-1000 μ L de plasma que se transfirieron a tubos eppendorf estériles. Este material se centrifugó (17530 g/15 min), procediendo a someter al taco celular formado a un proceso de extracción de ADN mediante DNA-zol (Gibco BRL[®]). Una alícuota de 1 μ L del material resultante fue utilizada como patrón para la PCR, empleando los cebadores 21-mer/22-mer e ILO1264/ILO1265, a las concentraciones óptimas establecidas en los ensayos preliminares.

RESULTADOS

La evaluación de la especificidad de ambos grupos de cebadores frente a combinaciones de concentraciones iguales de ADN de *T. evansi* TE0 y *T. vivax* ILO2160 se muestra en la Figura 1. En

este experimento se emplearon concentraciones de 0,45 pmol/ μ L y 0,23 pmol/ μ L de los cebadores 21-mer/22-mer e ILO1264/ILO1265, respectivamente. Cada par de oligonucleótido se usó individualmente en reacciones cuyas muestras patrón fueron mezclas de ADN de los aislados de referencia antes citados en concentraciones de 5 ng (carriles 1 y 6), 1 ng (carriles 2 y 7), 500 pg (carriles 3 y 8), 100 pg (carriles 4 y 9) y 10 pg (carriles 5 y 10). Los resultados mostraron que ambos grupos de cebadores fueron capaces de reconocer su secuencia homóloga y generar una amplificación específica, la cual se evidenció por la presencia de bandas de ADN acordes con el tamaño esperado de 227 pb para *T. evansi* y 400 pb para *T. vivax*. La diferencia en el tamaño de los productos de PCR permitió distinguir con claridad estas dos especies de parásitos. Para ambos grupos de cebadores ocasionalmente se evidenció un patrón de amplificación similar a un marcador de peso molecular, el cual estuvo constituido por múltiples monómeros del producto de amplificación; con los cebadores 21-mer/22-mer se observó además la presencia de multímeros de cebadores, por debajo del tamaño del fragmento específico esperado, los cuales fueron considerados artefactos de reacción. Este ensayo mostró un límite de detección de 10 pg de ADN de *T. evansi* (carril 5) y de 100 pg de ADN de *T. vivax* (carril 9).

El establecimiento del límite inferior de detección de ADN de *T. evansi* (TE0) mediante el uso de 21-mer/22-mer, bajo las condiciones de reacción descritas, se efectuó a través de una PCR en la que se emplearon concentraciones decrecientes de ADN (100 pg, 10 pg, 100 fg, 50 fg, 10 fg y 1 fg) y concentraciones de cebadores de 0,45 pmol/ μ L, 2,27 pmol/ μ L y 4,55 pmol/ μ L. La Figura 2A muestra los resultados de este ensayo, evidenciándose

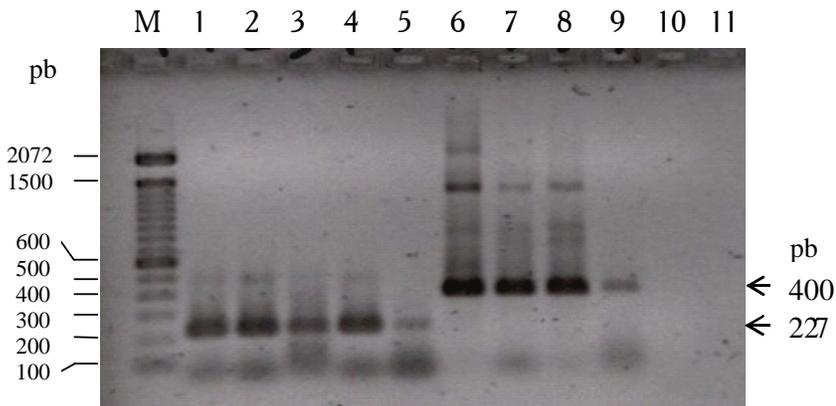


Figura 1. Productos de PCR a partir de mezclas de igual concentración de ADN de *T. evansi* TE0 y *T. vivax* ILO2160. Se sometieron a amplificación por PCR concentraciones decrecientes de las mezclas de ADN. Los productos de PCR fueron resueltos por electrofóresis en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo iluminación ultra violeta (carriles 1 y 6: 5+5 ng ADN; carriles 2 y 7: 1+1 ng ADN; carriles 3 y 8: 500+500 pg ADN; carriles 4 y 9: 100+100 pg ADN; carriles 5 y 10: 10+10 pg ADN; carril 11: Control negativo (sin ADN); M: marcador de peso molecular 1 kb-ladder. Las PCR fueron ejecutadas usando 0,45 pmol/ μ l de los cebadores 21-mer/22-mer (carriles 1 al 5) y 0,23 pmol/ μ l de ILO1264/ILO1265 (carriles 6 al 10)

que concentraciones de 0,45 pmol/ μ L (1) y 4,55 pmol/ μ L (3) permitieron amplificar hasta 10 pg de ADN (carriles 2 y 14); mientras que con 2,27 pmol/ μ L (2) se amplificó hasta 10 fg (carril 11); la positividad se evidenció por la presencia de una banda acorde al tamaño esperado (227 pb). Esta misma figura nos permitió evidenciar un notable incremento en los multímeros de cebadores formados, los cuales se presentaron con mayor intensidad a medida que la concentración de estos aumentó en la reacción. Un experimento con fines similares se efectuó usando ILO1264/ILO1265 a 0,23 pmol/ μ L y diluciones de ADN de *T. vivax* ILO2160 (10 ng, 1 ng, 500 pg, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 500 fg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 0,1 fg); los resultados se muestran en la Figura 2B, donde se observó el producto esperado en los carriles 1 al 5, con un límite de detección de 10 pg de ADN.

La Figura 3 muestra los resultados de un experimento donde se evaluó la especi-

ficidad de 21-mer/22-mer y se confirmó la sensibilidad de detección. La especificidad se evidenció por la ausencia de amplificación al utilizar como patrón ADN (10 ng) de *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *Leishmania donovani*, *Endotrypanum* sp., *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas* sp. y *Saccharomyces cerevisiae* (carriles 7-13), reflejando la especificidad de la reacción. Se apreció una importante señal positiva acorde con el tamaño del producto esperado cuando se empleó ADN (10 ng) de *T. brucei brucei* cepa 345 (carril 14), especie perteneciente al mismo subgénero de *T. evansi*. Este ensayo nos permitió igualmente confirmar el límite inferior de detección en 10 pg de ADN, similar a los resultados presentados en la Figura 1, pero empleando 3,18 pmol/ μ L como concentración de cebadores (carriles 1 al 5: ADN de *T. evansi* TE0: 10 pg, 1 pg, 500 fg, 100 fg, 10 fg); no obstante se evidenció una marcada formación de artefactos multiméricos. Resultados similares al

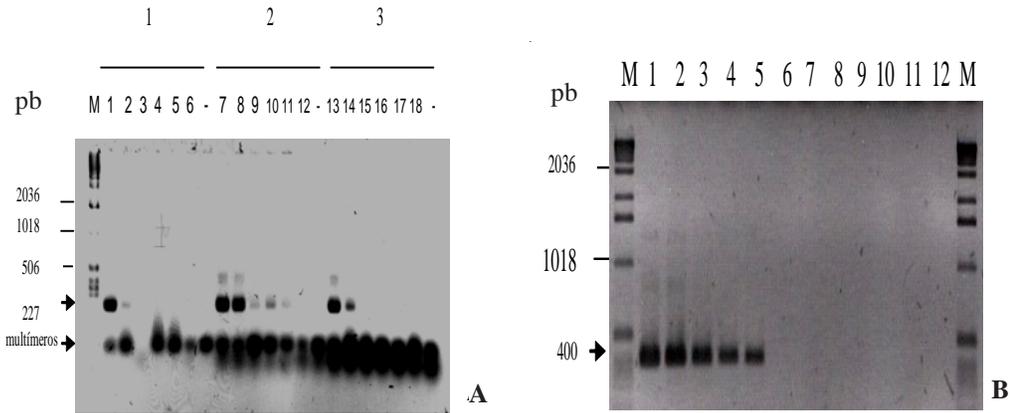


Figura 2. Productos de PCR a partir de ADN de: (A): *T. evansi* TE0 y (B): *T. vivax* ILO2160. (A): PCR usando 0,45 pmol/ μ l (1), 2,27 pmol/ μ l (2) y 4,55 pmol/ μ l (3) de los cebadores 21-mer/22-mer. Se sometieron a PCR concentraciones decrecientes de ADN de *T. evansi* (carriles 1, 7 y 13:100 pg; carriles 2, 8 y 14:10 pg; carriles 3, 9 y 15: 100 fg; carriles 4, 10 y 16: 50 fg; carriles 5, 11 y 17:10 fg; carriles 6, 12 y 18:1 fg; carriles marcados (-): control negativo sin ADN. (B): PCR usando 0,23 pmol/ μ l de los cebadores ILO1264/ILO1265. Se sometieron a PCR concentraciones decrecientes de ADN de *T. vivax* (carril 1:10 ng; carril 2: 1 ng; carril 3:500 pg; carril 4:100 pg; carril 5:10 pg; carril 6: 1 pg; carril 7: 500 fg; carril 8:100 fg; carril 9:10 fg; carril 10:1 fg; carril 11:0.1 fg; carril 12: control negativo, sin ADN. M:marcador de peso molecular 1kb-ladder. Los productos de PCR fueron procesados como se indicó en la Figura 1

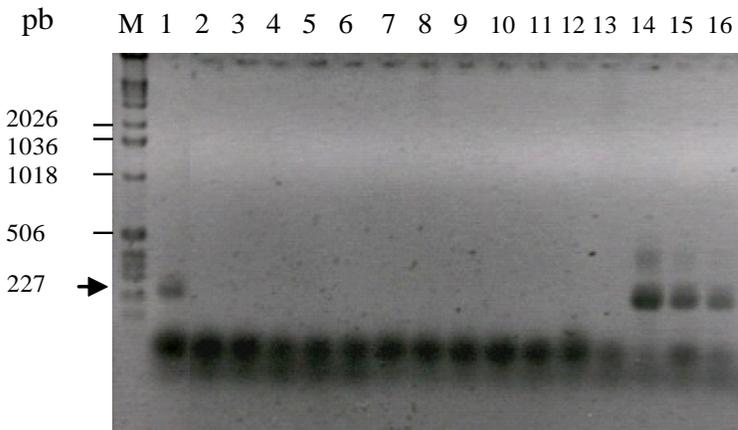


Figura 3. Productos de PCR a partir de ADN de *T. evansi* TE0 (carriles 1 al 5; 15 y 16) y diferentes especies de organismos (carriles 7 al 14). PCR fue ejecutada usando 2,27 pmol/ μ l (carriles 7 al 16) y 3,18 pmol/ μ l (carriles 1 al 6) de los cebadores 21-mer/22-mer. Se sometieron a PCR concentraciones decrecientes de ADN de *T. evansi* TE0: (carril 1: 10 pg; carril 2: 1 pg; carril 3: 500 fg; carril 4: 100 fg; carril 5: 10 fg; y de otras especies: (carriles 7 al 14: 10 ng de: *T. cruzi*, *T. rangeli*, *Leishmania donovani*, *Endotrypanum* sp., *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas* sp., *Saccaromyces cerevisiae*, *T. brucei*); Carril 6: control negativo, sin ADN; M: marcador de peso molecular 1kb-ladder. Carriles 15 y 16: controles positivos (100 y 10 pg de ADN de *T. evansi* TE0). Los productos de PCR se procesaron como se indicó en la Figura 1

valorar la sensibilidad y la especificidad de la PCR con los cebadores ILO1264/ILO1265 se obtuvieron para *T. vivax*, donde se demostró una detección mínima de 10 pg de ADN del aislado ILO2160 y una especificidad absoluta al no amplificarse ninguna de las muestras de ADN diferentes a *T. vivax* incluidas en los ensayos.

A fin de evaluar la especificidad del producto de amplificación de *T. evansi* y la localización cromosómica de su secuencia nucleotídica en el patrón de cariotipo de estos parásitos, se procedió a realizar una electrofóresis en campo pulsado sobre muestras de ADN cromosómico de los *Kinetoplastida*: *Crithidia fasciculata*, *Herpetomonas*, *Endotrypanum* sp., *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma evansi* TE0, empleando

como estándar de peso molecular ADN de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La Figura 4A muestra los resultados del patrón de cariotipo de estos organismos, evidenciándose que las condiciones de electrofóresis usadas permitieron una adecuada separación de bandas de ADN cromosomal; donde *T. evansi* presentó las más pequeñas con un rango de 50-370 kpb, las cuales se tiñeron intensamente (carriles 4 y 7). El gel con las bandas cromosomales fue transferido bidireccionalmente y los filtros hibridados con la sonda Te-ADN, preparada por marcación radioactiva (^{32}P) del producto de amplificación de *T. evansi*. La Figura 4B representa la autorradiografía resultante, en la que se evidencia una reacción de hibridación positiva para las muestras de los carriles 4 y 7, correspondientes al

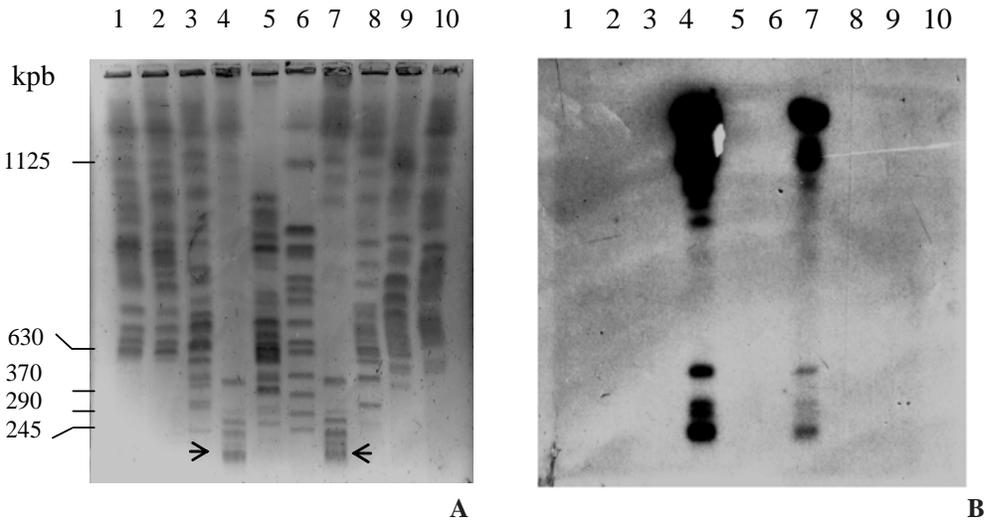


Figura 4. Cariotipo molecular de organismos *Kinetoplastida*. Los cromosomas de parásitos del Orden *Kinetoplastida* fueron fraccionados por electrofóresis de campo pulsado «CHEF» (220 volts, frecuencias de pulsos eléctricos ascendentes de 20, 40, 60 segundos, en tres bloques de 8 horas cada uno) en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio (Panel A). El gel fue transferido (Southern blotted) e hibridado con la sonda Te-ADN (Panel B). Carriles: 1: *Trypanosoma cruzi* Z2; 2: *Trypanosoma cruzi* Z1; 3: *Leishmania mexicana*; 4: *Trypanosoma evansi* TE0; 5: *Leptomonas* sp.; 6: cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* como marcador de peso molecular; 7: *Trypanosoma evansi* TE0; 8: *Leishmania donovani*; 9: *Herpetomonas*; 10: *Crithidia fasciculata*. Las flechas señalan las bandas de ADN cromosomal mas pequeñas en el patrón de kariotipo de *T. evansi* TE0.

ADN cromosomal de *T. evansi*. Se puede apreciar que la secuencia nucleotídica de dicha sonda reconoció su secuencia homóloga en bandas cromosómicas de diferente peso molecular en los carriles señalados; para el resto (carriles 1-3, 5-6, 8-10) no se evidenció ningún tipo de señal de hibridación. Este resultado evidenció, una vez más, la especificidad de la secuencia amplificada y demostró su carácter repetitivo por su localización en diferentes cromosomas.

Una vez evaluada la sensibilidad y la especificidad de los cebadores 21-mer/22-mer e ILO1264/ILO1265 sobre ADN purificado, se valoró la PCR para la detección de ADN de tripanosomas sobre muestras sanguíneas de animales con inoculación experimental. En muestras provenientes de ratones inoculados con *T. evansi* TE0 se observó la presencia del producto de amplificación esperado de 227 pb (datos no mostrados) usando una concentración de los cebadores 21-mer/22-mer de 0,45 pmol/ μ l. Se debe destacar que el sangrado de los ratones y el procesamiento de las muestras se efectuó al evidenciar positividad parasitológica por microcentrifugación capilar (Woo, 1969), por lo tanto los resultados de PCR fueron considerados verdaderos positivos. Muestras de sangre tomadas de la cola de los ratones 24 h post inoculación resultaron positivas por PCR, a pesar de haber sido negativas por TMC. Del mismo modo, se efectuaron ensayos de PCR sobre muestras recolectadas de ovinos con inoculación experimental del aislado *T. vivax* ILO2160, evidenciándose la presencia del producto de amplificación esperado (400 pb) en todas las muestras evaluadas, desde tres días antes de observarse positividad parasitológica (datos no mostrados).

Efectuadas las valoraciones antes descritas, se evaluó la PCR para la detección de *T. evansi* y *T. vivax* en las 86 muestras

sanguíneas recolectadas de búfalos. En este sentido, el empleo de los cebadores ILO1264/ILO1265 permitió la detección de nueve (9) muestras positivas a *T. vivax*, lo que representó un 10,47% de infección; en todas ellas se evidenció la amplificación de una banda de 400 pb acorde al tamaño esperado; permitiendo la identificación específica de la especie presente en todos los casos detectados positivos. No se observó ninguna amplificación cuando se emplearon los cebadores 21-mer/22-mer, sugiriéndose la ausencia de infección activa por especies del subgénero *Trypanozoon* en las muestras bufalinas evaluadas.

DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo fue optimizar un ensayo de PCR para la detección diferencial, específica y sensible de *T. evansi* y *T. vivax*. Para tal fin, se efectuó una fase inicial empleando como patrón ADN purificado de estas y otras especies, para luego evaluar el comportamiento de la técnica sobre muestras sanguíneas de animales con inoculaciones experimentales y finalmente sobre muestras de animales susceptibles a tripanosomas (búfalos de agua) en ambientes donde la enfermedad es prevalente.

En las reacciones con mezclas de ADN de *T. evansi* y *T. vivax* se generaron los productos específicos esperados para cada par de cebadores empleado, demostrando la alta especificidad de los mismos al poder distinguir su secuencia homóloga y generar una reacción positiva con una sensibilidad entre 10 y 100 pg de ADN purificado. Estos resultados plantean la posibilidad de detección de infecciones mixtas en muestras tomadas a campo, donde la complejidad y dinámica de la transmisión natural de tripanosomas en ambientes en los que coexisten ambas es-

pecies de protozoarios, numerosos vectores hematófagos, hospederos y reservorios, sugieren su potencial existencia. Diversos investigadores han detectado infecciones mixtas de *T. congolense*, *T. simiae*, *T. godfreyi*, *T. vivax* y *T. brucei* spp. en proboscis e intestinos de moscas tsetsé mediante PCR (Masiga *et al.*, 1992; Majiwa *et al.*, 1994; Masiga *et al.*, 1996; Ouma *et al.*, 2000), lo que plantea su posible existencia en *Tabanus* spp. y *S. calcitrans*, principales agentes transmisores en Venezuela. Los cebadores empleados en esta investigación generan productos de PCR de 227 y 400 pb para *T. evansi* y *T. vivax*, respectivamente, lo que es una importante ventaja para un diagnóstico diferencial. Las infecciones mixtas en vectores sugieren la existencia de mezclas de infecciones en hospedadores vertebrados, más aún cuando éstos son señalados susceptibles a más de una especie de tripanosoma; Clausen *et al.* (1998) detectaron 10,9 % de infecciones mixtas *T. brucei/T. vivax* a través de PCR en muestras sanguíneas bovinas.

Empleando los oligonucleótidos específicos del Subgénero *Trypanozoon* a 2,27 pmol/ μ L la sensibilidad de la PCR para amplificar ADN desnudo de *T. evansi* fue 10 fg; no obstante, la excesiva formación de multímeros de cebadores fue considerada una señal de poca eficiencia de la reacción. Ensayos con 0,45 pmol/ μ L permitieron amplificar hasta 10 pg de ADN, con reacciones de mayor eficiencia al reducirse significativamente las bandas multiméricas inespecíficas, estableciéndose como la concentración óptima de cebadores, para una sensibilidad de 10 pg.

Otros investigadores (Moser *et al.*, 1989; Clausen *et al.*, 1998) han logrado establecer límites de detección en el orden de los femtogramos de ADN para *T. brucei* spp. Sin embargo, la sensibilidad de 10 pg de ADN alcanzada en esta in-

vestigación pudiera mejorarse considerablemente al utilizar mejores sistemas de purificación de muestras, como ha sido planteado por otros investigadores (Desquesnes y Trece, 1996). Es importante señalar que teóricamente una sensibilidad de detección de 10 pg de ADN permitiría detectar la presencia de 50 parásitos, lo que es extraordinariamente superior a la evaluación de extendidos frescos (10^4 tripanosomas/ml), técnica de microcentrifugación capilar (500-1000 tripanosomas/ μ L) u otro método parasitológico convencional de diagnóstico de tripanosomiasis animal (Paris *et al.*, 1982). Estos resultados sugieren la posibilidad de detectar muestras positivas en hospedadores con bajos niveles de parasitemia. Para el diagnóstico y caracterización de *T. vivax* se emplearon diferentes concentraciones de los cebadores ILO1264/ILO1265, encontrándose que con 0,23 pmol/ μ L se logró amplificar hasta 10 pg de ADN en ausencia de artefactos o amplificaciones inespecíficas, estableciéndose como límite de detección. La sensibilidad fue ligeramente inferior a la reportada por Clausen *et al.* (1998); análogamente a lo antes discutido, la preparación de la muestra fue determinante en los resultados, los que sin embargo son superiores a los de métodos convencionales.

El estudio de la especificidad de los cebadores 21-mer/22-mer e ILO1264/ILO1265 se efectuó utilizando ADN purificado de diferentes organismos. Los resultados confirmaron la especificidad de 21-mer/22-mer al no evidenciarse producto de amplificación para ninguna de las especies evaluadas diferentes a *T. evansi*, a excepción de *T. brucei brucei*, organismo que pertenece a su mismo subgénero. Se debe resaltar que *T. evansi* es la única especie del subgénero *Trypanozoon* que se ha descrito en Venezuela y otros países de Latinoamérica, razón por la que este

grupo de cebadores puede emplearse sin mayores problemas de especificidad en el diagnóstico de infecciones por esta especie. Ensayos de PCR con los cebadores ILO1264/ILO1265 generaron reacción de amplificación positiva solo cuando la muestra de ADN patrón provino de *T. vivax*, mostrando una especificidad absoluta para esta especie.

La hibridación con la sonda Te-ADN sobre filtros con patrones cromosómicos permitió explorar la secuencia del producto amplificado en el genoma completo de *T. evansi* TE0 y de otros organismos incluidos en estos ensayos, demostrándose tanto la especificidad de la sonda como la distribución de su secuencia nucleotídica en cromosomas de distinto peso molecular. Se evidenció una fuerte señal de hibridación a nivel del cromosoma de menor peso molecular, lo que sugirió la presencia de un alto número de copias de la secuencia en dicho "mini-cromosoma". Eresh *et al.* (1993) y Mendoza-León *et al.* (1996) lograron aislar e identificar secuencias de ADN en minicromosomas de *Leishmania* sp. que han resultado ser específicas de subgénero y con un alto potencial en el diagnóstico específico. Análisis de cariotipos de *T. evansi* efectuados por Waitumbi y Young (1994) han mostrado un bajo grado de polimorfismo en el patrón de bandas cromosomales, en concordancia con el exhibido por *T. evansi* TE0 usado en esta investigación. En ambos casos se evidencia la presencia de minicromosomas (50-150 kpb) que se tiñen con gran intensidad con el bromuro de etidio; una zona intermedia con pocas bandas y una zona de compresión. Ambos arreglos demandan la realización de futuras investigaciones donde se aislen e identifiquen secuencias de ADN que puedan emplearse como sondas específicas.

La PCR sobre muestras sanguíneas recolectadas de animales con inoculación experimental resultó muy efectiva al identificar positividad en muestras provenientes de ratones inoculados con *T. evansi* y de ovinos inoculados con *T. vivax*, en ambos casos con confirmación parasitológica de la infección. La PCR mostró ser un método más sensible al detectar ADN de *T. evansi* a partir de 24 h post inoculación de los ratones y ADN de *T. vivax* 72 h antes de evidenciarse positividad por métodos parasitológicos. Wuyts *et al.* (1995) confirmaron la existencia de infección por *T. evansi* en muestras TMC negativas/PCR positivas mediante inoculación de ratones susceptibles y posterior evaluación parasitológica.

La alta sensibilidad y especificidad de la PCR quedó demostrada al detectar positividad en nueve (9) de las 86 muestras sanguíneas bufalinas recolectadas bajo condiciones naturales de explotación, para una tasa de detección ($9/86=10,47\%$) tres veces superior a la evaluación microscópica de frotis sanguíneos ($3/86=3,49\%$) y aproximadamente dos veces mayor a la TMC ($6/86=6,98\%$), aplicadas al mismo grupo de muestras. La alta especificidad permitió la identificación de *T. vivax* como la especie presente en las muestras bufalinas. No se detectó positividad para *T. evansi*. Estos resultados nos permiten afirmar que los búfalos evaluados, a pesar de ser susceptibles a *T. evansi* y *T. vivax*, están siendo parasitados por este último, hecho que no es común en países asiáticos y africanos donde la tripanosomiasis bufalina asociada a *T. evansi* es la hemoparasitosis de mayor importancia debido a la patogenicidad y amplia difusión del protozoo (Löhr *et al.*, 1986; Luckins, 1988; Artama *et al.* 1992). Este hallazgo representó el primer reporte de identificación molecular de tripanosomas

en búfalos en Venezuela, con la consecuente contribución al desarrollo e implementación de estrategias para el control de los parásitos y de los vectores involucrados en la transmisión, ya que *T. vivax* y *T. evansi* presentan diferencias en el comportamiento epidemiológico y de susceptibilidad a quimioterapéuticos.

CONCLUSIONES

En este trabajo describimos el desarrollo de un ensayo de PCR para el diagnóstico diferencial de *T. evansi* y *T. vivax*. La técnica estandarizada permitió la detección de ADN de ambas especies con sensibilidad de 10 pg de ADN purificado, lo que hace posible detectar infecciones muy tempranas e infecciones crónicas. La PCR mostró ser una técnica con mucha sensibilidad de detección y con la capacidad de diferenciar entre ambas especies, así como posibles infecciones mixtas. Se identificó al *T. vivax* como la única especie presente en las muestras bufalinas evaluadas. Este ensayo puede ser utilizado conjuntamente con métodos parasitológicos y serológicos como una herramienta de gran valor para la evaluación de programas de control de tripanosomiasis animal, permitiendo obtener un mejor estimado de la presencia de parásitos tanto en los hospederos vertebrados como en los invertebrados vectores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue soportado financieramente por el Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT) adscrito al Ministerio de Ciencia y Tecnología de Venezuela, a través de la Subvención a la Investigación Científica S1-2001000988, así como por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela a través del Pro-

yecto de Investigación PI: 11-10-4832-2001.

REFERENCIAS

- Artama, W.; Agey, M. and Donelson, J. 1992. ADN comparisons of *Trypanosoma evansi* (Indonesia) and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitol.* 104: 67-74.
- Clausen, P.; Wiemann, A.; Patzelt, R.; Kakaire, D.; Poetzsch, C.; Peregrine, A. and Mehlitz, D. 1998. Use of a PCR assay for the specific and sensitive detection of *Trypanosoma* spp. in naturally infected dairy cattle in peri-urban Kampala, Uganda. *Ann. New York Acad. of Sci.* 849: 21-31.
- Contreras, I.; Soto, H.; Gavidia, J.; Silva, L. y Bello, A. 2001. Efecto de la infección experimental de *Trypanosoma vivax* sobre el peso, condición corporal y algunas características reproductivas en carneros mestizos de la raza tropical West African. *Rev. Fac. Cs. Vets-UCV.* 42:125-133.
- Desquesnes, M. and Tresse, L. 1996. Evaluation de la sensibilité de la PCR pour la détection de l'ADN de *Trypanosoma vivax* selon divers modes de préparation des échantillons sanguins. *Rev. É. Méd. Vét. Pays Trop.* 49: 322-327.
- Eresh, S.; Mendoza-León, A. and Barker, D. 1993. A small chromosome of *Leishmania (viannia) brasiliensis* contains multicopy sequences which are complex specific. *Act. Trop.* 55: 33-46.
- Hoare, C. 1965. Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes. *Acta Trop.* 22:204-216.
- Kukla, B.; Majiwa, P.; Young, J.; Moloo, S. and ole-Moiyoi, O. 1987. Use of species-

- specific ADN probes for detection and identification of trypanosome infections in tsetse flies. *Parasitol.* 95:1-16.
- Löhr, K.; Pholpark, S.; Siriwan, P.; Leesirikul, N.; Srikitjakarn, L. and Staak, C. 1986. *Trypanosoma evansi* infection in buffaloes in north-east Thailand. II. Abortions. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 18: 103-108.
- Luckins, A. 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol. Today.* 4:137-142.
- Majiwa, P.; Thatthi, R.; Moloo, S.; Nyeko, J.; Otieno, L. and Maloo, S. 1994. Detection of trypanosome infections in the saliva of tsetse flies and buffy-coat samples from antigenaemic but aparasitaemic cattle. *Parasitol.* 108:313-322.
- Masake, R.; Majiwa, P.; Moloo, S.; Makau, J.; Njuguna, J.; Maina, M.; Kabata, J.; Ole-MoiYoi, O. and Nantulya, V. 1997. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma vivax* using the polymerase chain reaction. *Exp. Parasitol.* 83:193-205.
- Masiga, D.; McNamara, J.; Laveissière, C.; Truc, P. and Gibson, W. 1996. A high prevalence of mixed trypanosome infections in tsetse in Sinfra, Côte d'Ivoire, detected by ADN amplification. *Parasitol.* 112: 75-80.
- Masiga, D.; Smyth, A.; Hayes, P.; Bromidge, T. and Gibson, W. 1992. Sensitive detection of trypanosomes in tsetse flies by ADN amplification. *Int. J. for Parasitol.* 22: 909-918.
- McManus, D. and Bowles, J. 1996. Molecular genetic approaches to parasite identification: Their value in diagnostic parasitology and systematics. *Int. J. Parasitol.* 26:687-704.
- Mendoza-León, A.; Shaw, J. and Tapia, F. 1996. A guide for the cutaneous leishmaniasis connoisseur. En: Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. (F. Tapia, G. Dittmar y M. Sanchez, eds.). R.G. Landes Company. pp 1-23.
- Moser, D.; Kirchhoff, L. and Donelson, J. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27:1477-1482.
- Ouma, J.; Masake, R.; Masiga, D.; Moloo, S.; Njuguna, J. and Ndung'u. 2000. Comparative sensitivity of dot-ELISA, PCR and dissection method for the detection of trypanosome infections in tsetse flies (*Diptera: Glossinidae*). *Acta Trop.* 75:315-321.
- Paris, J.; Murray, M. and McOdimba, F. 1982. A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle. *Acta Trop.* 39:307-316
- Nantulya, V. 1990. Trypanosomiasis in domestic animals: The problems of diagnosis. *Rev. É. Méd. Vét. Pays. Trop.* 9:357-367.
- Rivera, M. A., 1996. Trypanosomiasis. En: Hemoparasitosis Bovinas. Anauco Ed, Caracas-Venezuela. pp 13-84.
- Smith, G. and Summer, M. 1980. The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose or diazobenzoyloxymethyl-paper. *Ann. Biochem.* 109:123-129.
- Toro, M.; León, E.; López, R.; García, J. y Ruíz, A. 1980. Resultados de un muestreo sobre tripanosomiasis bovina mediante técnicas serológicas. *Vet. Tropical.* V:43-50.
- Waitumbi, J. and Young, J. 1994. Electrophoretic karyotyping is a sensitive epidemiological tool for studying *Trypanosoma evansi* infections. *Vet. Parasitol.* 52:47-56.
- Woo, P.T. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can. J. Zool.* 47:921-923.
- Wuyts, N.; Chokesajjawatee, N.; Sarataphan, N. and Panyin, S. 1995. PCR amplification of crude blood on microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma*