

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TRIPANOSOMOSIS ANIMAL CAUSADA POR *Trypanosoma evansi*¹

Eglys B. González M.*, Bernardo González***,
Roschman González**, Nancy Linares*****,
Alfredo Mijares*****, Trina Perrone*****, y Marta Mendoza***

RESUMEN

Existen varios métodos para el diagnóstico de la tripanosomosis equina, *Trypanosoma evansi*, cuya sensibilidad varía según la etapa de la enfermedad. Recientemente, métodos moleculares como el PCR, basado en la detección de ADN, han mejorado el diagnóstico de las parasitosis. El objetivo de este trabajo fue estandarizar, comparar y evaluar la técnica de PCR para el diagnóstico de *T. evansi* en un modelo experimental múrido. Para ello, se infectaron ratones con el aislado TEVA1. Luego de 48 (horas) se realizó la evaluación parasitológica por cuantificación de Brener y por la técnica de microhematocrito Woo. Para el diagnóstico molecular se purificó el ADN genómico y se amplificó por PCR, empleando los cebadores específicos para *T. evansi*, ESAG 6/7, TEV1/2 y TBR1/2. Todos los cebadores evaluados rindieron el producto de amplificación esperado, excepto en los animales sanos. Los cebadores ESAG 6/7 presentaron una sensibilidad de 1ng de ADN proveniente de parásitos purificados, y de 10ng para muestras proveniente de sangre completa. Del total de ratones infectados, 47% (n=8) resultaron positivos por el método de Brener, 70% (n=12) por Woo y todos por PCR (100%). Estos resultados demostraron que la PCR es más eficiente y sensible que los métodos parasitológicos para la detección de *T. evansi* en modelo múrido, cuando se presentan parasitemias muy bajas.

Palabras Clave: *Trypanosoma evansi*; diagnóstico; PCR.

1 Financiado por BID-FONACIT. Proyecto N° G-2000001152 y 2004000400

* Estudiante de Doctorado, mención Microbiología, ****Investigadores y *****Profesionales de Apoyo a la Investigación. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). E-mail: gonzalezeglys@yahoo.com

** Tesista de Doctorado. Universidad Central de Venezuela (UCV).

*** Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios (CEBIV). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológico (IDECYT).

RECIBIDO: febrero 20, 2006

**STANDARDIZATION OF A POLIMERASE CHAIN
REACTION TECHNIQUE FOR THE DIAGNOSIS
OF ANIMAL TRYPANOSOMIASIS CAUSED BY
*Trypanosoma evansi*¹**

Eglys B. González M.*, Bernardo González*,
Roschman González**, Nancy Linares*****,
Alfredo Mijares*****, Trina Perrone*****, y Marta Mendoza*****

SUMMARY

There are several methods to diagnose this illness, equine trypanosomiasis, caused by *Trypanosoma evansi* and their sensibility varies depending on the disease stage. Recently, molecular methods, like PCR, based on DNA detection have improved the diagnosis of this disease. The purpose of this work was to standardize, differentiate and evaluate the PCR technique for the diagnosis of *T. evansi* in an experimental murine model. Mice were infected with TEVA1. After 48 hours they were evaluated using the parasitological methods of Brener's quantification and the Woo haematocrit centrifuge technique. For molecular diagnosis, genomic DNA was purified and amplified by PCR using primers specific for *T. evansi*: ESAG 6/7, TEV1/2 y TBR1/2. All primers rendered the expected product of amplification, except when non infected animals were used. Primers ESAG 6/7 showed a sensibility of 1ng using DNA from purified parasites and of 10ng using DNA from whole blood samples. From the total of mice infected, 47% (n=8) were positive by Brener's method, 70% (n=12) by Woo's method, and all (100%) by the PCR technique. This result indicates that the PCR technique is much more efficient and sensitive than the parasitological methods used for diagnosing *T. evansi* in a murine model when there is low concentration of parasites.

Key Words: *Trypanosoma evansi*; diagnosis; PCR.

1 Financiado por BID-FONACIT. Proyecto N° G-2000001152 y 2004000400

* Estudiante de Doctorado, mención Microbiología, ****Investigadores y *****Profesionales de Apoyo a la Investigación. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). E-mail: gonzalezegly@yahoo.com

** Tesista de Doctorado. Universidad Central de Venezuela (UCV).

*** Profesores. Universidad Nacional Experimental Simón Rodríguez (UNESR). Centro de Estudios Biomédicos y Veterinarios (CEBIV). Instituto de Estudios Científicos y Tecnológico (IDECYT).

RECIBIDO: febrero 20, 2006

INTRODUCCIÓN

La tripanosomosis equina causada por *Trypanosoma evansi*, presenta una alta prevalencia en Venezuela. Esta parasitosis produce el deterioro físico y hasta la muerte de los caballos utilizados para el manejo del ganado, generando pérdidas económicas a causa de esta enfermedad.

Estudios realizados en la sabana venezolana indican una seroprevalencia del 81,7% de tripanosomosis equina en caballos de trabajo ganadero (Reyna-Bello *et al.*, 1998). En la fase aguda de la enfermedad se producen altas parasitemias que son detectadas por métodos parasitológicos directos, mientras que en la fase crónica estos pierden sensibilidad debido a las baja parasitemia presente. En esta fase, son más sensibles y precisos los métodos serológicos, basados en la detección de anticuerpos específicos, sin embargo estos no diferencian entre infecciones activas y tratadas y no identifican al patógeno. Recientemente se ha introducido el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para mejorar el diagnóstico de esta enfermedad. El objetivo de este trabajo fue estandarizar, comparar y evaluar la técnica de PCR para el diagnóstico de *T. evansi* en modelo experimental múrido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se inocularon 17 ratones ♀NMRI con 100 parásitos/g peso del aislado TEVA1 (referencia). A las 48 horas post-infección se colectaron muestras de sangre para: 1) evaluar la parasitemia, por observación directa al microscopio óptico (Brener, 1962) y por la técnica de microhematocrito (Woo, 1969); y 2) extraer ADN genómico para realizar el PCR.

Estandarización del PCR para el diagnóstico de *T. evansi*. Se extrajo el ADN usando el Kit comercial Wizard a partir de la capa blanca de 1ml de sangre total y se amplificó por PCR utilizando tres pares de cebadores en un volumen final de reacción de 25 µl conteniendo Buffer 1X, dNTPs 200µM c/u, 300ng de ADN, e individualmente ver Cuadro.

Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los cebadores ESAG 6/7. Se extrajo el ADN de los siguientes parásitos purificados: *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma vivax*, *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi*, *Crithidia fasciculata* y *Leptomonas colossoma*, y de sangre de ratón

infectado con TEVA1. La concentración de ADN se cuantificó por espectrofotometría, y se evaluaron concentraciones de 300 a 0,1 ng de ADN por PCR. Se realizó electroforesis de los productos obtenidos en geles de agarosa al 2%, teñidos con SYBR-safe™ 1,5X (Molecular Probes), y se visualizaron bajo luz UV.

CUADRO. Condiciones de las distintas mezclas de reacción y del proceso de ciclaje.

Reactivos	TEV 1/2		ESAG 6/7		TBR 1/2		
	Wuyts <i>et al.</i> 1995		Holland <i>et al.</i> 2001		Artama <i>et al.</i> 1992		
MgCl ₂ (mM)	2,0		3,0		1,5		
Taq (Unidades)	2		1,5		1		
Cebador1 (μM)	0,25		0,5		0,4		
Cebador2 (μM)	0,25		0,5		0,4		
Programa (°C x min)							
Desnaturalización	94 x 7		94 x 7		94 x 3		
Desnaturalización	94 x 1		94 x 1		94 x 0,75		
Hibridización	ciclos	58 x 1	30	55 x 1	30	60 x 1	30
Extensión	72 x 1		72 x 1		72 x 0,5		
Extensión	-		72 x 5		72 x 5		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cebadores evaluados amplificaron el ADN de *T. evansi* presente en los controles positivos, y no en los controles negativos. Los cebadores TBR1/2 rindieron un producto de varias bandas y TEV1/2 una banda débil, por lo que se seleccionaron para diagnóstico los cebadores ESAG 6/7 al rendir una banda intensa y clara de ~237pb. Los cebadores seleccionados amplificaron el ADN de aislados provenientes de distintos hospedadores y no amplificaron el ADN proveniente de otros tripanosomatideos, resultando específicos para *T. evansi*. La sensibilidad del PCR mostró un mínimo de ADN detectable correspondiente a 1 ng para parásitos

purificados, y de 10 ng para sangre completa. Cuando se compararon los resultados de PCR *versus* las otras técnicas de detección, se obtuvieron los siguientes resultados:

Método de detección	Brener	Woo	PCR
# de muestras positivas	8	12	17
Prevalencia	47%	70%	100%
Parasitemia (parásitos ml ⁻¹)	10 ⁴ - 10 ⁶	10 ³ - 10 ⁴	< 10 ³

Estos resultados indican que la PCR podría detectar bajas parasitemias presentes en la etapa de prepatencia de esta enfermedad. Sin embargo, en los casos donde la parasitemia era muy baja o indetectable por las técnicas parasitológicas fue necesario incrementar la cantidad de ADN genómico a amplificar, para obtener 100% de sensibilidad en el ensayo molecular. Esto se debe a la disminución del número de parásitos por volumen de sangre evaluada. Estos resultados indican que los cebadores ESAG 6/7 podrían ser considerados como candidatos en la estandarización de una técnica de detección múltiple en animales de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- ARTAMA, W. T., M. W. AGEY and J. E. DONELSON. 1991. DNA comparisons of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma brucei* spp. *Parasitology*. 104:67-74.
- BRENER, Z. 1962. Therapeutic activity and criteria of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 4:389-396.
- HOLLAND, W. G., F. CLAES, L. N. MY, N. G. THANH, P. T. TAM, D. VERLOO, P. BÜSCHER, B. GODDEERIES and J. VERCRUYSE. 2001. A comparative evaluation of parasitological tests and a PCR for *Trypanosoma evansi* diagnosis in experimentally infected water buffaloes. *Veterinary Parasitology*. 97:23-33.

REYNA-BELLO A., F. GARCÍA, M. RIVERA, B. SANZO and P.M. ASO. 1998. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Veterinary Parasitology*. 80:149-157.

WOO, P. T. 1969. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*. 47:921-923.

WUYTS, N., N. CHOKESAJJAWATEE, N. SARATAPHAN and S. PANYIM. 1995. PCR amplification of crude blood of microscope slides in the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection in dairy cattle. *Annales de la Société belge de Médecine Tropicale*. 75:229-237.