

Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma Cruzi*

Paula Pavía Bact. *,
Claudia Cuervo Biol. *,
Marleny Montilla Msc**,
Santiago Nicholls MD. MSc.**,
Concepción Puerta Ph.D. *

Resumen

Objetivo: *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, presenta dos tipos de unidades H2A: 1,2 y 0,76 Kb. Dada la ausencia de la unidad de 1,2 Kb en *T.rangeli*, en este trabajo se desarrolló una prueba de PCR para la detección de *T.cruzi*, usando como blanco este gen. **Materiales y Métodos:** los oligonucleótidos TcH2AF y TcH2AR fueron diseñados usando el programa Oligo TM versión 4.0 for Macintosh. La reacción de PCR (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, triton x-100 0,1%, dNTPs 200 mM, cebadores 20 pmoles, MgCl₂ 1,5 mM, Taq DNA polimerasa 1,25 U y ADN 125 ng) fue sometida al siguiente programa en un termociclador PTC-100 MJ-Research: denaturación 95 °C por 5 min, 15 ciclos con denaturación a 95 °C por 30 s, anillaje y

extensión a 72 °C por 1 min y 20 ciclos con anillaje a 65 °C durante 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio. **Resultados:** TcH2AF/R amplifican una banda de 230 pb en cepas pertenecientes a los Zimodemas I, II y III de *T.cruzi*, con una sensibilidad de 1fg aun en la presencia de ADN heterólogo; mientras que no amplifican el ADN de cepas de *T.rangeli* tanto KP1(+) como KP1(-). **Conclusiones:** esta PCR constituye una herramienta potencial para la detección de *T.cruzi* en muestras biológicas de vector, humano y/o ratón. **Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, Histona H2A, PCR. ☼

Infectio 2003; 7(3): 129-136

Introducción

La enfermedad de Chagas, producida por *Trypanosoma cruzi* y transmitida por insectos de la familia *Reduviidae*, es una parasitosis de amplia distribución geográfica que afecta aproximadamente a 17 millones de personas en 15 países de América Latina, siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad (1). En la fase inicial de la infección, debido a la gran circulación de parásitos en sangre, el diagnóstico se realiza mediante frotis de sangre periférica. En la siguiente etapa de la enfermedad, denominada fase indeterminada, si bien no se

presentan síntomas, el paciente constituye un reservorio del parásito que ayuda al mantenimiento del ciclo de vida del mismo. Un 30% de estos pacientes desarrolla la tercera fase, la fase crónica de la enfermedad, la cual se manifiesta con alteraciones cardíacas, digestivas o neurológicas, que pueden conducir a la muerte. En estas dos últimas etapas, la circulación del parásito en la sangre disminuye sensiblemente; por lo tanto se debe recurrir a otras técnicas de diagnóstico (1,2).

Desde hace una década, la reacción en cadena

Recibido para evaluación: junio 9 de 2003 - Aceptado para publicación: agosto 12 de 2003

* Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá - Colombia.

** Laboratorio de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá - Colombia.

Correspondencia: Concepción Puerta, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá - Colombia. E-mail: cpuerta@javeriana.edu.co

Este trabajo ocupó el primer puesto en la categoría básica en el concurso de investigaciones del VI Congreso Colombiano de Enfermedades Infecciosas realizado en Cartagena del 4 al 7 de junio de 2003.

de la polimerasa (PCR) ha sido empleada de manera exitosa como una herramienta de diagnóstico molecular en la detección de agentes infecciosos (3). La elección del ADN como objetivo para el diagnóstico ofrece las siguientes ventajas: (i) todas las secuencias de ADN están presentes en todas las etapas del ciclo de vida del parásito, (ii) todos los organismos contienen secuencias de ADN que pueden ser empleadas para diferenciar individuos, especies o géneros y (iii) a diferencia de los métodos inmunológicos, estos métodos son independientes de la inmunocompetencia del individuo o de la historia de infecciones previas (4).

Dentro del anterior contexto, se han desarrollado diversas pruebas de PCR con la finalidad no sólo de diagnosticar *T. cruzi*, sino también de diferenciarlo de su contraparte no patogénica, *Trypanosoma rangeli* (5,6); parásito que comparte huéspedes, reservorios y vectores con *T. cruzi* en las mismas áreas geográficas, de manera que se ha documentado la existencia de infecciones mixtas (7,8).

Por otra parte, los genes que codifican para la histona H2A de *T. cruzi* se encuentran repetidos en tándem formando dos agrupaciones, compuestas por unidades intercaladas de 1,2 y 0,76 Kb (9). Estos genes se diferencian básicamente por la presencia del elemento SIRE (Elemento corto repetido disperso) en la región 3' no codificante de los genes de 1,2 Kb (10,11).

Estudios recientes han demostrado que SIRE, elemento de 428 pb, se encuentra presente en cerca de 1 500 a 3 000 copias por genoma dependiendo de la cepa, está distribuido en todos los cromosomas y es especie-específico de *T. cruzi* (12). SIRE además presenta una organización compleja, encontrándose presente en la región intergénica de los genes TcP2β (13), así como también en la región 3' de ARN mensajeros de proteínas como la histona H2A, 2-hidroxiácido deshidrogenasa, oligopeptidasa, amanosidasa lisosomal, aldehído deshidrogenasa y de otros marcos de lectura abiertos no identificados; contribuyendo además en algunos casos a la formación del sitio de poliadenilación y del extremo carboxilo terminal del producto codificado (13,14).

Dentro del anterior contexto, en este trabajo se presenta el diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*, basada en la amplificación de 230 pb de la región 3' no codificante de la unidad H2A de 1,2 Kb, las cuales hacen parte del elemento SIRE insertado en este gen.

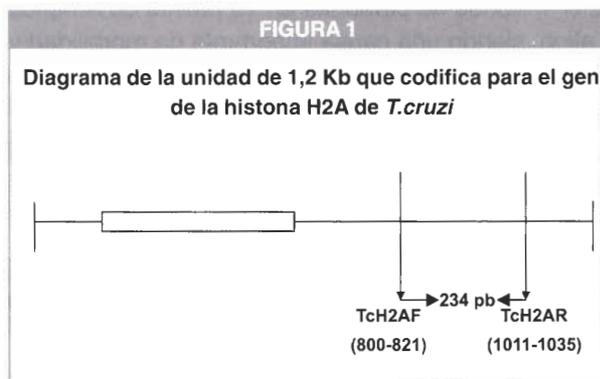
Métodos

Obtención de los parásitos: se trabajó con formas epimastigotas de *T. cruzi* y *T. rangeli* (tabla 1), obtenidas por los laboratorios de Parasitología del Instituto Nacional de Salud (INS) y de Investigación en Parasitología Tropical de la Universidad del Tolima, caracterizadas por isoenzimas (15) y PCR (16). La obtención en masa de los parásitos se realizó en medio REI modificado líquido (infusión de cerebro corazón: 10 g/l, NaCl 8 g/l, KCl 8 g/l, MgSO₄ 7 H₂O 0,2 g/l, NaHPO₄ 0,06 g/l, CaCl₂ 0,07 g/l, glucosa 2 g/l, NaHCO₃ 1g/l), suplementado con 2% de suero fetal bovino (SFB) y 100 mg/ml de gentamicina a 24 °C (17).

Obtención de triatomíneos: se trabajó con *Rhodnius prolixus* adultos libres de infección, mantenidos en el Laboratorio de Parasitología del INS, los cuales fueron descontaminados y disecados, previamente a la extracción del ADN a partir del contenido intestinal (16).

Diseño de iniciadores: en primer lugar se seleccionó la región del gen de 1,2 Kb (9) blanco de amplificación, mediante estudios de bioinformática utilizando los programas FASTA (18), MULTIALIN (19) y L-ALIGN (18). Los oligonucleótidos se diseñaron con base en dicha región, usando el programa OligoTM versión 4.0 for Macintosh. Lic 6496 (1990). National Bioscience, Inc. Plymouth (figura 1).

Extracción del ADN: el ADN de los parásitos fue extraído según lo indicado por Escalante et al. 1997 (20). Para la extracción de ADN humano se siguió el protocolo descrito por Sambrook et al. 2000 (21).



Las cebadores TcH2AF/R y la región que amplifican se indican en azul. Los números en paréntesis indican la posición de cada cebador en la secuencia y el bloque, la región codificante.

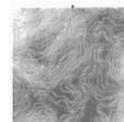


TABLA 1

Características de las cepas de los parásitos

Parásito	Grupo	Cepa	Código	Procedencia
<i>T. rangeli</i>	1 KP1(-)	C23 5048 Tre	MAOT/CO/82/C-23 MHOM/CO/99/5048 -	Sucre Magdalena -
	2 KP(+) P19	H14 Choachí I/PRX/CO/84/P19	MHOM/Hond/H14 IRHO/CO/86/Choachí N. Santander	Honduras Cundinamarca
<i>T. cruzi</i>	Zimodema I	No.3 BMLópez Mrangel Ikiakarora Shubacbarina Munanta Tulahuen	MDID/CO/87No.3 MHOM/CO/87BMLópez MHOM/CO/86Mrangel IRHO/CO/95Ikiakarora IRHO/CO/95Shubacbarina IRHO/CO/85Munanta ITRI/CHI/82/Tulahuen	N. Santander Cundinamarca Cesar N. Santander N. Santander Boyacá Chile
	Zimodema II	Y	MHOM/BR/00/Y	Brasil
	Zimodema III	CANIII	MHOM/BR/68/CANIII	Brasil

El ADN extraído se analizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % utilizando TAE como solución tampón (Tris HCl 0.04 M pH 7,2, ácido acético glacial 29,6 mM y EDTA 2 mM pH 8) con posterior tinción con bromuro de etidio (Sigma) a una concentración final de 0,5 mg/ml. Finalmente, la concentración del ADN se midió por espectrofotometría a UV_{260 nm}, teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica (DO) equivale a 50 mg por ml de ADN de doble cadena (21).

Ensayos de PCR: la reacción se realizó en un volumen final de 25 ml, conteniendo: Tris-HCl 10 mM pH 9.0, KCl 50 mM, triton x-100 0,1 %, dNTPs 200 mM, cebadores 20 pmoles, MgCl₂ 1,5 mM, Taq DNA polimerasa 1,25 U y ADN 125 ng. Esta reacción fue sometida al siguiente programa en un termociclador PTC-100 MJ-Research: denaturación 95 °C por 5 min, 15 ciclos con denaturación a 95 °C por 30 s, anillaje y extensión a 72 °C por 1 min y 20 ciclos con anillaje a 63 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s. Como control negativo se utilizó la misma reacción pero con la adición de agua en reemplazo del ADN.

Análisis del producto de amplificación: una alícuota de 10 ml de la reacción de PCR fue visualizada en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio (21)

Determinación de la especificidad de la PCR *in vitro*: la especificidad se determinó usando como blanco de amplificación el ADN de cepas de *T. cruzi* pertenecientes a los zimodemas I, II y III, así como también de cepas pertenecientes a los grupos 1 y 2 de *T. rangeli* (22), y de otros tripanosomátidos tales como *Leishmania* y *Crithidia*.

Determinación de la sensibilidad de la PCR *in vitro*: la sensibilidad de la prueba se determinó tanto mediante amplificación de diluciones en base 10 del ADN desnudo del parásito, como por amplificación de éstas mismas diluciones en presencia de 50 ng/ml de ADN heterólogo (humano y ratón).

Resultados

Ensayos de PCR: luego de estandarizar las condiciones de la reacción se encontró que en todas

las cepas de *T.cruzi* se amplificó la banda esperada de 230 pb, mientras que en las muestras de *T.rangeli* tanto KP1 (+) como KP1(-), ADN humano, de ratón, de vector y el control negativo, no se observó banda de amplificación (figura 2).

Determinación de la especificidad: una vez determinado que la pareja de cebadores TcH2AF/R amplificaba la banda esperada en todas las muestras de *T.cruzi*, se procedió a realizar la prueba de PCR con un número mayor de cepas de *T.rangeli*, representantes de los grupos 1 (KP1-) y 2 (KP1+) de este parásito (22); así como también con ADN de otros tripanosomátidos como *Crithidia* y *Leishmania*. Para ello, se extrajo el ADN de todas las cepas y se realizó la prueba con 125 ng de ADN desnudo, obteniendo solamente la banda esperada exclusivamente en las muestras de *T.cruzi* (figura 3). Para corroborar que el resultado negativo en las muestras no obedeciera a ausencia de ADN o a la presencia de inhibidores de la PCR, se realizó una PCR usando los oligonucleótidos KMP11F/R, los cuales amplifican una banda de 300 pb correspondientes a la región codificante de la proteína KMP11 en *T. cruzi* y *T.rangeli*. Los resultados evidencian la banda esperada en todas las muestras, confirmando que la negatividad de la PCR usando los cebadores TcH2AF/R se debe a la especificidad de la prueba (resultados no mostrados).

Determinación de la sensibilidad: para determinar la cantidad de ADN desnudo que los cebadores TcH2AF/R eran capaces de amplificar, se realizó un ensayo de PCR utilizando cantidades decrecientes de ADN desnudo del parásito, iniciando con 10 pg de ADN.

Es así como en la figura 4, se observa amplificación de la banda esperada hasta con 1 fg de ADN. Teniendo en cuenta que según lo descrito por Kooy et al. 1989 (23); 200 fg de ADN total del parásito corresponden al ADN de un parásito, con esta prueba se puede detectar hasta 1/200 del parásito.

Dado que al aplicar las pruebas de PCR a muestras biológicas, hay que tener en cuenta las posibles interferencias del ADN procedente del hospedador, se realizaron una serie de ensayos de PCR en la presencia de ADN heterólogo tanto humano como de ratón. Es así como los resultados obtenidos muestran que el ADN heterólogo no inhibe la reacción, ni afecta la sensibilidad de la misma (resultados no mostrados).

Adicionalmente, dadas las posibles interferencias

con la reacción de PCR que pueda tener el contenido intestinal de triatomíneo al aplicar la prueba de PCR directa en la muestra del vector; se realizó una prueba de sensibilidad con ADN desnudo del parásito en presencia de contenido intestinal de adultos de *R.prolixus*, encontrándose que la sensibilidad de la reacción no es afectada (resultados no mostrados).

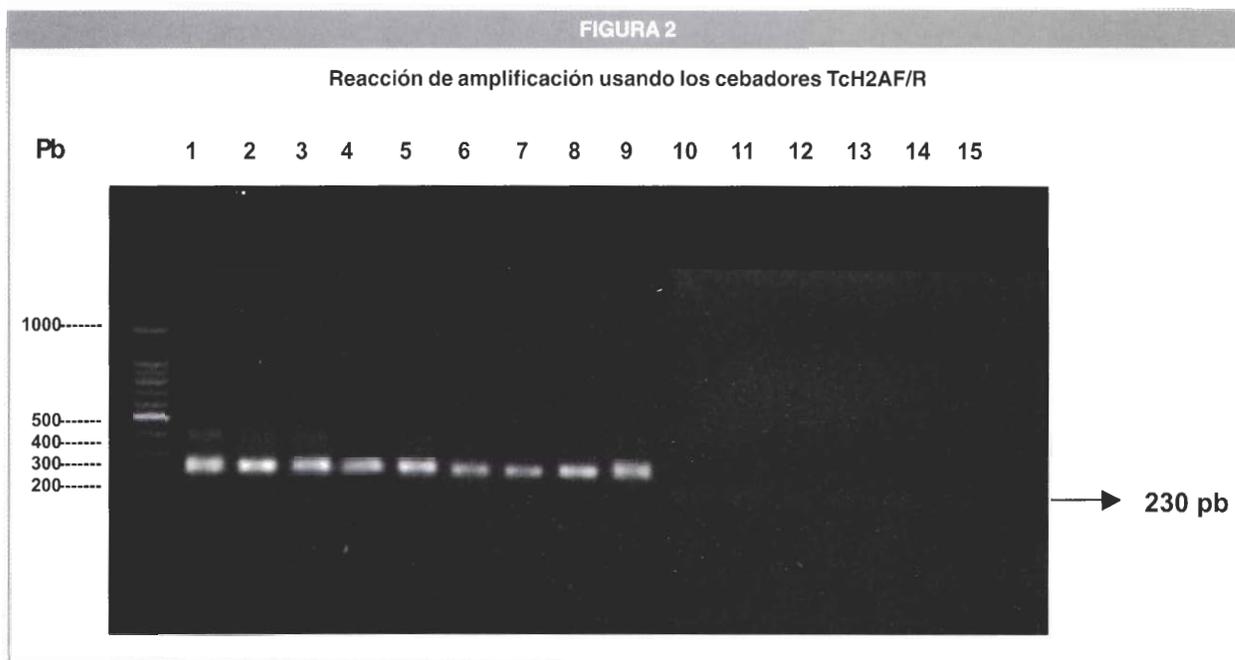
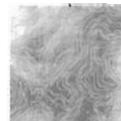
Finalmente, dada la ocurrencia de infecciones mixtas con *T.cruzi* y *T.rangeli*, tanto en el vector como en los reservorios y humanos (7,8); se realizaron pruebas de PCR en la presencia de ADN de cantidades variables de *T.rangeli*. Es así como en la figura 5 se observa como la presencia de menor, igual o mayor cantidad de ADN de *T.rangeli*, no interfiere en la amplificación del ADN de *T.cruzi*.

Discusión

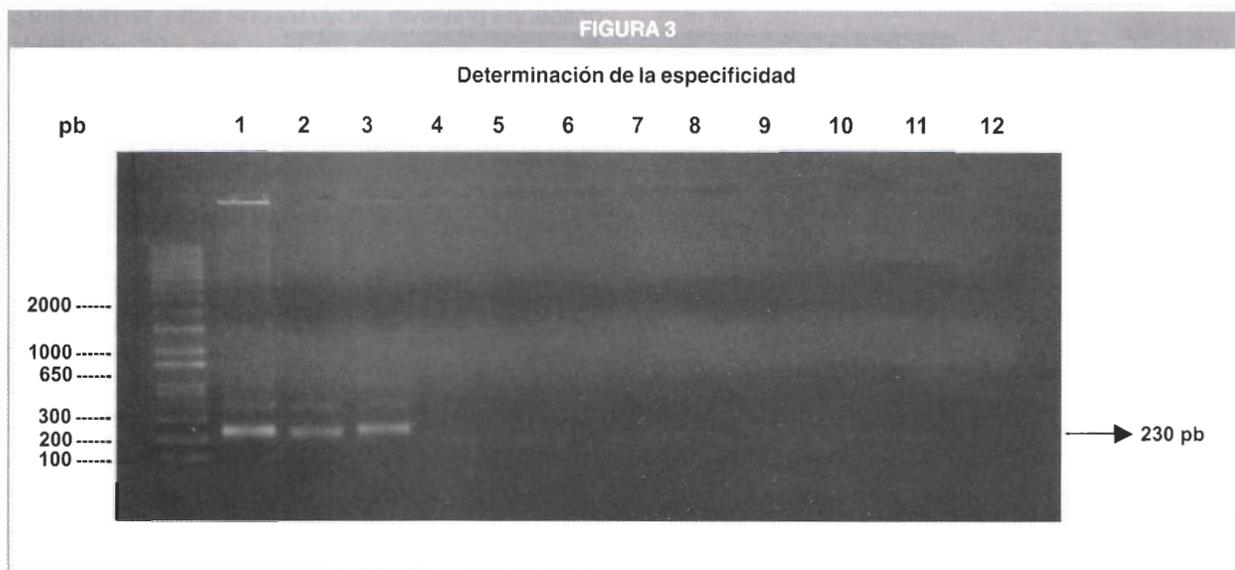
La prueba de PCR estandarizada con base en los genes de 1,2 Kb codificantes para la histona H2A de *T.cruzi* muestra una alta especificidad, por cuanto detecta exclusivamente ADN de *T.cruzi*, tanto zimodema I como zimodema II y III, y no presenta señal de amplificación con los ADNs de *T.rangeli* KP1(+) o KP1(-). Estos resultados concuerdan con la ausencia de SIRE y de unidades de 1,2 Kb codificantes para la histona H2A en el genoma de *T.rangeli* (24, 25). Adicionalmente, los cebadores TcH2AF/R no amplifican el ADN de otros tripanosomátidos como *C. fasciculata* y *L. amazonensis*, así como tampoco ADN humano, de ratón o de vector.

Por otra parte, dado que con esta prueba se puede detectar hasta 1/200 del contenido de ADN de un parásito, aún en la presencia de ADN heterólogo humano o de ratón, o de contenido intestinal de vector; esta PCR se ubica como una de las pruebas que utilizan ADN nuclear como blanco con mayor sensibilidad. A este respecto, vale la pena comentar como las pruebas de PCR que usan como molde ADN nucleares, aún cuando en general presentan menos moléculas blanco en relación al kADN del minicírculo, tienen la ventaja de indicar infección activa; ya que según lo reportado por Teixeira et al. 1994 (26), existe la posibilidad de que el kADN se integre a la célula del huésped, y por lo tanto éste tipo de prueba no pueda aplicarse para el seguimiento de la parasitemia post tratamiento.

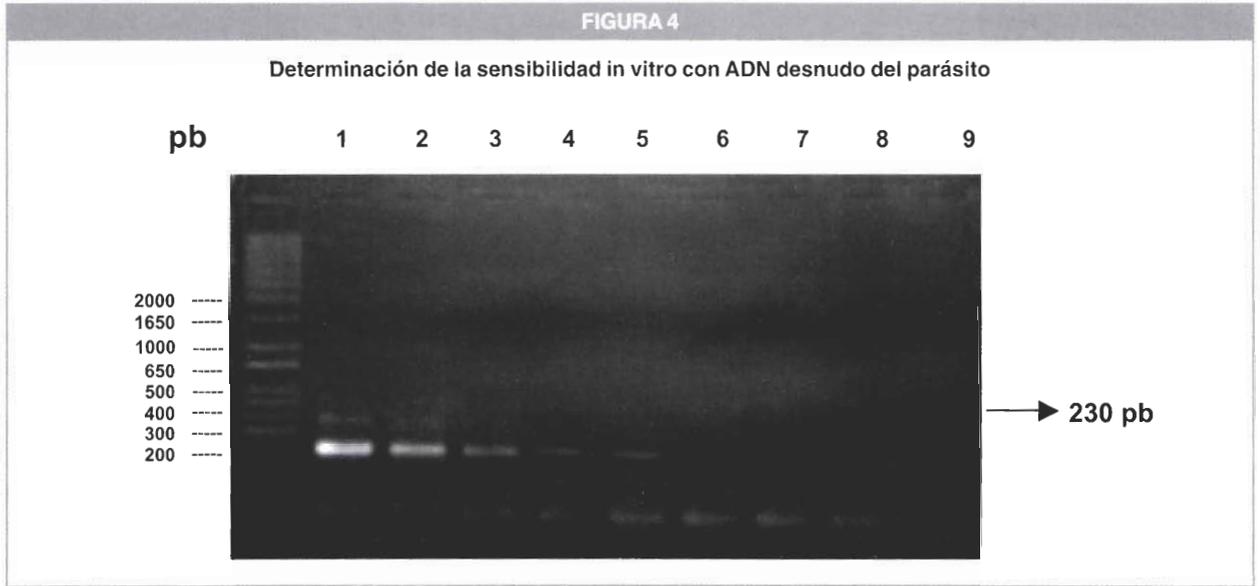
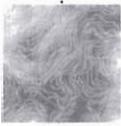
Finalmente, es importante resaltar que dada la presencia de infecciones mixtas tanto en el humano como en los reservorios y vectores de ambos tripanosomas; la amplificación del ADN de *T.cruzi* no es inhibida por la presencia de *T.rangeli*.



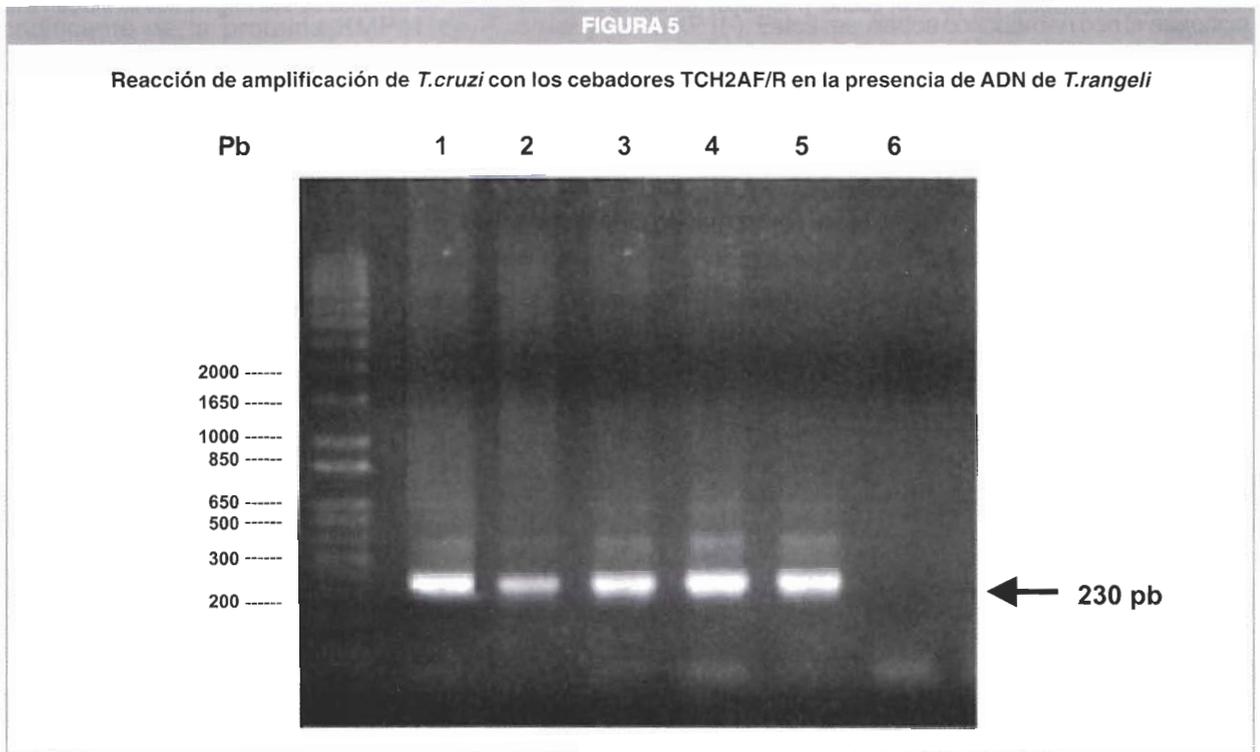
Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % coloreado con bromuro de etidio conteniendo 10 ml del producto de PCR obtenido de los ADNs de *T. cruzi*: No.3 (1), Shubacbarina (2), Ikiakarora (3), M. Rangel (4), B.M.López (5), Munanta (6), Tulahuen (7), Y (8), CANIII (9), *T. rangeli*: 5048 (10), H14 (11) y ADN humano (12), de ratón (13) y de *R.prolixus* (14). En el control negativo (15) se usó agua destilada como templado. 100 pb DNA Ladder (Promega) fue usado como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.



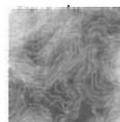
Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % coloreado con bromuro de etidio conteniendo 10µl del producto de PCR obtenido de los ADNs de *T. cruzi*: B.M.López (1), Y (2), CANIII (3) y de los ADNs de *T. rangeli*: Tre Almudena (4), Choachi (5), 5048 (6), C23 (7), P19 (8), ADN humano (9) *Leishmania amazonensis* (10), *Crithidia fasciculata* (11) y en el control negativo (12), se usó agua destilada como templado. 1 Kb Plus (Invitrogen) fue usado como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.



Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % coloreado con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de PCR usando como molde cantidades decrecientes del ADN de la cepa BM López de *T. cruzi*. 10 pg (1), 1 pg (2), 100 fg (3), 10 fg (4), 1 fg (5), 0,1 fg (6), 0,01 fg (7), 0,001 fg (8) y en el control negativo (9), se usó agua destilada como templado. 1 Kb Plus (Invitrogen) fue usado como marcado; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.



Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5 % coloreado con bromuro de etidio conteniendo 10 μ l del producto de PCR usando como cantidades diferentes de ADN de la cepa No. 3 de *T. cruzi* (Tc) y Choachi de *T. rangeli* Tr): 125 ng de Tc y 250 ng de Tr (1), 250 ng de Tc y 125 ng de Tr (2), 125 ng de Tc y Tr (3), 125 ng de Tc y 50 ng de Tr (4), 50 ng de Tc y 125 ng de Tr (5) y en el control negativo(6) se usó agua destilada como templado. 1 Kb Plus (Invitrogen) fue usado como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.



Dados los anteriores resultados, la prueba de PCR desarrollada constituye una herramienta potencial para el diagnóstico de *T. cruzi* en muestras biológicas tanto de vectores como de reservorios y de humanos infectados. ☉

Agradecimientos

Este proyecto contó con la financiación por parte de Colciencias de un Joven Investigador, Convenio Especial 031-2002.

Abstract

Objective: *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease, presents two types of H2A units: 1.2 and 0.76 Kb. Due to the absence of the 1.2 Kb unit in *T. rangeli*, in this work, a PCR test for detecting *T. cruzi* was developed, using this gene as target. **Materials and Methods:** the primers TcH2AF and TcH2AR were designed using the Oligo TM 4,0 version for Macintosh program. The PCR reaction (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, triton x-100 0.1 %, dNTPs 200mM, primers 20 pmoles, MgCl₂ 1.5 mM, Taq DNA polymerase 1.25 units and DNA 125 ng) was submitted to the following program in a PTC-100 MJ-Research Thermocycler: denaturation at 95 °C for 5 min, 15 cycles involving denaturation at 95 °C for 30 s, annealing and extension for 1 min and 20 cycles involving annealing at 65°C for 30 s and extension at 72 °C for 30 s. The amplified products were visualized in 1.5 % agarosa gels stained with ethidium bromide. **Results:** TcH2AF/R primers specifically amplified a 230-bp fragment in Zimodemes I, II and III strains of *T. cruzi*. The amplification allowed the detection of 1 fg of DNA in the presence of heterologous DNA whereas no amplification was observed with different *T. rangeli* strains (groups 1 and 2). **Conclusions:** this PCR constitutes a potential tool for the detection of *T. cruzi* in biological samples of vector, human and/or mouse. **Key words:** *Trypanosoma cruzi*, H2A histone, PCR.

Referencias

1. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** Control de la enfermedad de Chagas. Informe de un Comité de Expertos. Serie de Informes Técnicos. Ginebra. 2002: N° 905.
2. **Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Withner M.** Chagas Disease. Clin Microbiol Rev 1992;5: 400-9.
3. **Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE.** Detection of *T. cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1989;27:1477-82.
4. **Barker DC.** Molecular approaches to DNA diagnosis. Parasitology 1989;99 Suppl.:S125-46.
5. **Vallejo GA.** Estudios comparativos entre las secuencias de kDNA de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la tripanosomiasis Americana. Actual Biol 1998;20:43-56.
6. **Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA.** Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Arch Med Res 2002;33:362-70.
7. **D' Alessandro A, Saravia N.** *Trypanosoma rangeli*. En: Parasitic Protozoa, JP Kreir, JR Baker, eds. Academic Press, INC. New York, USA. 1992;2:1-54.
8. **D' Alessandro A, Saravia N.** *Trypanosoma rangeli*. En: Protozoal Diseases, HM. Gilles ed. Arnold Publisher, London, U.K. 1999:398-412.
9. **Puerta C, Martín J, Alonso C, López MC.** Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1994;64:1-10.
10. **Marañón C, Puerta C, Alonso C, López MC.** Control mechanism of the H2A genes expression in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1998;92: 313-24.
11. **Thomas MC, Olivares M, Escalante M, Marañón C, Montilla M, Nicholls S, et al.** Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop 2000;75:203-10.
12. **Vázquez MP, Lorenzi H, Schijman AG, Ben-Dov C, Levin MJ.** Analysis of the distribution of SIRE in the nuclear genome of *Trypanosoma cruzi*. Gene 1999;239:207-16.
13. **Vázquez MP, Schijman AG, Levin MJ.** A short interspersed repetitive element provides a new 3' acceptor site for *trans-splicing* in certain ribosomal P2b protein genes of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1994;64:327-36.
14. **Vázquez M, Ben-Dov C, Lorenzi H, Moore T, Schijman A, Levin MJ.** The short interspersed repetitive element of *Trypanosoma cruzi*, SIRE, is part of VIPER, an unusual retroelement related to long terminal repeat retrotransposons. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:2128-33.
15. **Rodríguez P, Montilla M, Nicholls RS, Zarante I, Puerta C.** Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 1998;93:739-40.