



DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DIRETA DE *Trypanosoma cruzi* I e II e *Trypanosoma rangeli* KP1+ e KP1- EM SANGUE HUMANO PELO RFLP-COII

KAREN YUKI KIMOTO (PIBIC/FA/UEM), AMANDA REGINA NICHII DE SÁ
(Colaborador), MÔNICA LÚCIA GOMES (Orientador)
e-mail: mlgomes@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas, Protozoologia de parasitos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, RFLP-COII

Resumo:

Trypanosoma cruzi e *Trypanosoma rangeli* são parasitos hemoflagelados que infectam os mesmos vetores e hospedeiros. A identificação específica destes dois parasitos é importante já que ambos compartilham antígenos solúveis propiciando a reação sorológica cruzada o que dificulta o diagnóstico específico da doença de Chagas. Misturas entre TcI e TcII de *T. cruzi*, KP1+ e KP1- de *T. rangeli* foram realizadas em diferentes proporções (90% à 10%) nas quantidades de 100 parasitos/200uL sangue à 2 parasitos/200uL. O DNA foi extraído e a PCR/RFLP-COII foi realizada. Nas misturas, *T. cruzi* se mostrou mais sensível ao marcador sendo detectado até 2 parasitos/200uL de sangue pela presença da banda diagnóstica de 80pb e genotipado com 5 parasitos/200uL até a proporção de Tc/Tr 25%. *T. rangeli* pode ser detectado até 25 parasitos/200uL de sangue e genotipado com 50 parasitos/200uL de 25 a 10% de Tc/Tr para Kp1+ e de 25 a 5 parasitos/200uL dependendo da proporção (75 a 10% de Tc/Tr) para KP1-. Conclui-se que esse marcador (RFLP-COII) possui valor epidemiológico e de diagnóstico, pois dispensa o isolamento do parasito, excluindo a possibilidade de seleção parasitária ou de alguma DTU/KP1+/KP1-, tornando a genotipagem mais rápida e correta.

Introdução

Trypanosoma cruzi, responsável pela doença de Chagas, circula entre vetores, reservatórios domésticos e silvestres e humanos, afetando atualmente 6 milhões de pessoas na América Latina (WHO, 2015). *Trypanosoma rangeli*, outro parasito hemoflagelado, apesar de presente em seres humanos e outros mamíferos, não causa patogenicidade para estes



hospedeiros. *T. cruzi* e *T. rangeli* são conjuntamente estudados, pois ambos compartilham as mesmas regiões geográficas, hospedeiros e vetores (Vallejo *et al.*, 2002). A presença simultânea destas duas espécies facilita infecções mistas em ambos os tipos de hospedeiros e, devido ao grande número de antígenos solúveis compartilhados a reação sorológica cruzada pode ocorrer, dificultando o diagnóstico específico da doença de Chagas (Parada *et al.*, 2010).

Pela análise molecular, *T. cruzi* é separado em seis Unidades de Tipagens Distintas (DTU) TcI à TcV (Zingales *et al.*, 2009) e *T. rangeli* é dividido em dois grupos, KP1+ e KP1- (Vallejo *et al.*, 2002). Marcadores moleculares propostos são capazes de detectar e diferenciar *T. cruzi* de *T. rangeli* (Souto *et al.*, 1999; Fernandes *et al.*, 2001), entretanto apenas separam as duas espécies de parasitos sem diferenciar seus grupos filogenéticos. A separação de *T. cruzi* e *T. rangeli* e, simultaneamente, seus grupos filogenéticos foi proposto por Sá *et al.* (2013) avaliando o maxicirculo de kDNA pela análise do polimorfismo do fragmento de restrição da Citocromo Oxidase II (RFLP-COII). Sabendo-se que o cultivo dos parasitos e a manutenção de cultura para obtenção de massa parasitária, pode levar a seleção populacional (Demeu *et al.*, 2011), faz-se necessário estabelecer um protocolo para pesquisa direta de *T. cruzi* e/ou *T. rangeli* em amostras biológicas com infecções mistas.

Com base nessas informações o objetivo desse trabalho foi realizar a pesquisa direta e determinar a sensibilidade do PCR/RFLP-COII em detectar, *T. cruzi* (TcI e TcII), e *T. rangeli* (KP1+ e KP1-) em amostras de sangue humano contaminado com diferentes proporções desses parasitos.

Materiais e métodos

As cepas 150 (TcI), 1256 (TcII), Choachi (KP1+) e SC-58 (KP1-) foram mantidas em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 28°C. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e os valores adaptados para que todas as culturas obtivessem o mesmo número de parasitos por 1uL. Após o ajuste, uma mistura de TcI+TcII e outra de KP1+ + KP1- foram realizadas nas quantidades de 100 parasitos/200uL até 2 parasitos/200uL. Estas misturas foram diluídas em sangue humano na presença de Guanidina/EDTA 6,0M/0,2M (1:1) em diferentes proporções que variam de 90% a 10% para cada grupo (TcI/TcII e KP1+/KP1-). Após sete dias o sangue foi fervido por 7 minutos e estocado por 3 dias a 8°C até a extração de DNA realizada com fenol-clorofórmio e resuspendido em 10µL de água Mili-Q estéril (Gomes *et al.*, 1998). A amplificação da subunidade 2 do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COII) foi realizada como descrito por Sá *et al.*, (2013) em temperatura de anelamento de 50°C com iniciadores Tcmit-10 e Tcmit-21 em volume final de 15µL. Como amostras referência para o estudo foram utilizadas as mesmas cepas do experimento. Do produto de



PCR, 10µL foram digeridos com a enzima restrição *Alu* I (Biolabs - New England) por 16 horas e a análise do RFLP foi feita em gel de poliácridamida a 6%, revelado pela prata e fotografado.

Resultados e Discussão

A PCR/RFLP-COII foi capaz de detectar e simultaneamente separar *T. cruzi* (Tcl e TcII) de *T. rangeli* (KP1+ e KP1-) diretamente do sangue humano, indicando que o isolamento e cultivo do parasito poderia ser dispensado. Pela análise do RFLP-COII bandas de aproximadamente 280pb + 80pb referem-se para Tcl, 250pb + 80pb para TcII, 280pb + 120pb para KP1+ e 400pb para KP1- (Figura 1A e B). O marcador foi capaz de detectar nas misturas os dois parasitos e os grupos genéticos igualmente até a concentração de 50 parasitos por amostra nas proporções de 90% a 10% para Tcl, TcII e Kp1- e de 25 a 10% de Tc/Tr para Kp1+ (Figura 1A). De 25 a 2 parasitos há diferenças na sensibilidade de detecção e genotipagem para as duas espécies. Para *T. cruzi*, o marcador tem maior sensibilidade com limite de detecção de 2pa/200uL evidenciado pela banda diagnóstica de 80pb (Sá *et al.* 2013) e limite de genotipagem de 5pa/200uL de sangue até a proporção de Tc/Tr 25% na amostra (Figura 1B) . Para *T. rangeli*, o marcador é mais sensível para detectar KP1- do que KP1+. KP1- é detectado com 25 a 5 parasitos/200uL de sangue dependendo da proporção (75 a 10% de Tc/Tr) (Figura 1A, 1B).

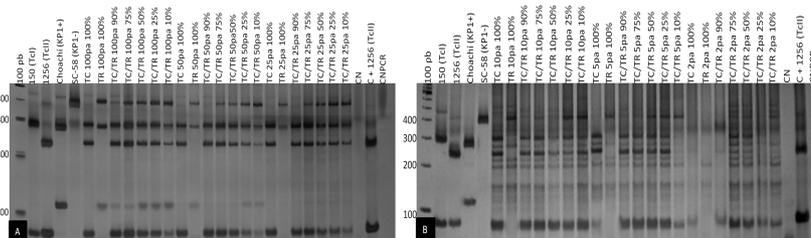


Figura 1. Perfis em gel de poliácridamida a 6,0% do RFLP-COII de *Trypanosoma cruzi* (TC= Tcl e TcII) e *Trypanosoma rangeli* (TR= KP1+ e KP1-) misturados em diferentes proporções (90/10, 75/25, 50/50, 25/75, 10/90%) e diluídos em 200uL de sangue humano. 150 (Tcl), 1256 (TcII), Choachí (KP1+) e SC-58 (KP1-) são amostras de referência. **Figura 1A:** Diluições de 100 parasitos à 25 parasitos em 200uL de sangue. **Figura 1B:** Diluições de 10 parasitos à 2 parasitos em 200uL de sangue. CN= Controle negativo da extração. CNPCR= Controle negativo da PCR. C+: controle positivo TcII (1256). 100pb: DNA Ladder (Peso molecular).

Conclusões

A análise do polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição (RFLP) de COII é capaz de identificar e genotipar diretamente a presença de *T. cruzi* (Tcl e TcII) e de *T. rangeli* (KP1+ e KP1-) em sangue humano mesmo em diferentes proporções. Conclui-se que esse marcador possui valor epidemiológico e de diagnóstico, pois dispensa o isolamento do parasito, excluindo a possibilidade de seleção parasitária ou de alguma DTU/KP1+/KP1-, tornando a genotipagem mais rápida e correta.



Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Araucária (FA) e a Universidade Estadual de Maringá pela colaboração na execução deste projeto através do Programa de Iniciação Científica.

Referências

Demeu, L. M. K.; Sá. A. R. N.; Araujo, S. M.; *et. al.* Two molecular tools for detection of natural and artificial mixed infections of *Trypanosoma cruzi*. **Anais do XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology/ XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease**. Foz do Iguaçu. 2011.

Gomes M. L.; Macedo A. M.; Vago A. R.; *et. al.* *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp Parasitol**. v. 88, p. 28-33, 1998.

Parada C. V.; Alvarez M.; Puig N; *et. al.* *Trypanosoma rangeli* in a blood donor at the Valencian Blood Transfusion Centre. **Vox Sang**. v. 99, p. 1934, 2010.

Sá, A.M; Steindel, M.; Demeu, L.M; *et. al.* Cytochrome oxidase subunit 2 gene allows simultaneous detection and typing of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Parasites & Vectors**. v. 6, p. 363, 2013.

Souto R. P.; Vargas N. Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. **Exp Parasitol**. v. 91, p. 306-14, 1999.

Vallejo, G.A.; Guhl, F.; Carranza, J. C.; Lozano, L. E.; *et. al.* kDNA markers define two major *Trypanosoma rangeli* lineages in Latin-America. **Acta Trop**. v. 81, p. 77-82, 2002.

WHO (World Health Organization). Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> Acesso em 14 de junho de 2015.

Zingales, B.; Andrade, S.G.; Briones, *et. al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 1051-1054, 2009.