

MEMORANDA

**RESUMEN DEL TALLER SOBRE EL USO DE LA REACCION EN
CADENADE LA POLIMERASA (PCR) PARA DISTINGUIR ENTRE
TRYPANOSOMA CRUZI Y *TRYPANOSOMA RANGELI***

*David Campbell¹, Clara Isabel González², Carlos Jaramillo³, Marleny Montilla⁴,
Winston Rojas⁵, Luz Angela Labrada⁶, William López, Diego Mejía⁶,
Yaneth Osorio⁶, Cecilia Santrich⁶.*

Este taller se realizó con el propósito de transferir la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* a laboratorios en Colombia involucrados en el diagnóstico y estudios epidemiológicos de la enfermedad de Chagas. Para demostración de la técnica se utilizaron muestras clínicas y epidemiológicas de áreas endémicas colombianas.

En los ensayos se emplearon muestras de tripanosomas provenientes de diferentes medios de cultivo para evaluar el posible efecto de los componentes de estos medios sobre la sensibilidad del PCR. Se hizo extracción de ADN utilizando los métodos de ebullición, lisis hipotónica y *geneclean*. El ADN se amplificó utilizando oligonucleótidos sintéticos, correspondientes a una secuencia conservada de 22 nucleótidos dentro de un gen mini-exón. Los dos organismos fueron distinguidos por las movilidades electroforéticas de sus respectivos productos de amplificación, confirmando su identidad con sondas intergénicas específicas de especie, marcadas con digoxigenina dUTP. La hibridación se visualizó con la reacción de color del NBT.

De un total de 28 muestras analizadas, se lograron 17 identificaciones que coincidieron con la clasificación original. De cinco muestras desconocidas, tres fueron identificadas como *T. rangeli* y dos como infecciones mixtas. Se presentaron resultados ambiguos en dos muestras, ocasionados por contaminación en el PCR.

Solamente dos muestras no se pudieron identificar mediante PCR por problemas en la extracción del ADN de la muestra.

Teniendo en cuenta estos resultados preliminares se abre la posibilidad de utilizar esta técnica como una herramienta útil o método adicional a las técnicas de rutina para detectar y diagnosticar la enfermedad de Chagas en Colombia.

¹ Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de California, Los Angeles, California 90024, U.S.A.
² Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander
³ Universidad de los Andes, Laboratorio de Microbiología y Parasitología, Santafé de Bogotá.
⁴ Instituto Nacional de Salud, Grupo de Parasitología, Santafé de Bogotá.
⁵ Universidad de Antioquia, Departamento de Biología, Medellín, Antioquia.
⁶ Fundación Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas - CIDEIM, Cali.

INTRODUCCION

En Colombia, Panamá, Bolivia y Venezuela la detección y el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi*, el agente causal de la enfermedad de Chagas, puede ser complicado por los falsos positivos debido a la estrecha relación que existe con el protozooario *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* y *T. rangeli* comparten el mismo hospedero y vector (*Rhodnius* y *Triatoma*) y poseen antígenos de reacción cruzada.

Debido a que *T. cruzi* es patógeno para humanos y *T. rangeli* no lo es, resulta importante distinguir los dos organismos en infecciones humanas y en estudios epidemiológicos de los insectos vectores y reservorios naturales (zarigüeyas, perros, ratones, etc.)

Los dos organismos no siempre pueden ser diferenciados morfológicamente utilizando coloración de Giemsa. Ambos pueden ser distinguidos por técnicas inmunológicas (1); sin embargo, a menudo se observa una reacción antigénica cruzada en el inmunodiagnóstico (2). Murthy *et al.*, (3) han propuesto amplificación de regiones genómicas y miniexónicas usando la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) como otro criterio para distinguir entre los dos organismos. Con este motivo se realizó un taller en la Fundación CIDEIM con los siguientes objetivos:

1. Transferir la tecnología de detección específica a laboratorios en Colombia involucrados en la detección y diagnóstico de la enfermedad de Chagas .
2. Probar la técnica con muestras clínicas y epidemiológicas de áreas endémicas.

Participantes de cinco instituciones en Colombia suministraron cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* junto con cepas de tripanosomas no identificadas para su caracterización mediante la técnica de PCR.

MATERIALES Y METODOS

La tabla 1 describe las cepas de tripanosomas suministradas por cada participante durante el taller. Para cada cepa se incluye: el origen geográfico y biológico, la presunta identificación de la cepa mediante isoenzimas y/o comportamiento biológico y el medio en que se cultivaron cada una de ellas.

Cuadro # 1

CEPA/CODIGO	ORIGEN GEOGRAFICO	LABORATORIO PROVEEDOR	MEDIO DE CULTIVO	IDENTIFICACION	FUENTE DE AISLAMIENTO
IRHO/CO/691 Guateque	Guateque, Boyacá	(1)	Maekelt's más REI modificado 2% SFB	<i>T. cruzi</i>	Rhodnius prolixus
MHOM/CO/92 F. Chaparro	Tibú, N. de Santander		Maekelt's más REI modificado 2% SFB	<i>T. cruzi</i>	Humano
MAOT/CO/82/C23	San Marcos, Sucre		Tobie más REI modificado 2% SFB	<i>T. rangeli</i>	Aotus trivirgatus
HRAT/CO/87/530	Durania, N. de Santander		NNH más Schneider 20% SFB	Desconocida	Rattus rattus
MDID/CO/88/No 3	Mariquita, Tolima		NNH más Schneider 20% SFB	Desconocida	Didelphis marsupialis
MDID/CO/87/R12	Ricaurte, Cundinamarca		NNH más Schneider 20% SFB	Desconocida	Didelphis marsupialis
LDG	San Carlos, Antioquia	(2)	LIT	<i>T. rangeli</i>	Humano
J-1	San Carlos, Antioquia		LIT	<i>T. rangeli</i>	Rhodnius pallescense
J-2	San Carlos, Antioquia		LIT	<i>T. rangeli</i>	Rhodnius pallescense
FX-17	Galeras, Sucre		LIT	<i>T. cruzi</i>	Didelphis marsupialis
SC1	San Carlos, Antioquia		LIT	<i>T. cruzi</i>	Rhodnius pallescense
Nery Suarez	Galeras, Sucre		LIT	<i>T. cruzi</i>	Humano
Su-5	Galeras, Sucre		LIT	<i>T. cruzi</i>	Rhodnius pallescense
STP3.1	Coyalina, Tolima		LIT	<i>T. cruzi</i>	Rhodnius prolixus
RSUB	Galeras, Sucre		LIT	<i>T. rangeli</i>	Bradypus tridactylus
Xeno 11	Ubaque, Cundinamarca	(3)	LIT	<i>T. rangeli</i>	Humano
CP1	Bajo Calima, V. del Cauca		LIT	<i>T. cruzi</i>	Triatoma dispar
334	San Andrés de Sotavento, Córdoba		LIT	Desconocida	Cannis familiaris
T328	San Andrés de Sotavento, Córdoba		LIT	Desconocida	Didelphis marsupialis
Atanasio	Magdalena	(4)	LIT modificado	<i>T. cruzi</i>	Humano
Miguel Rangel	Simití, Bolívar		LIT modificado	<i>T. cruzi</i>	Humano
Gonzalo Castillo	Bucaramanga, Santander		LIT modificado	<i>T. cruzi</i>	Humano
Marina	San Vicente, Magdalena		LIT modificado	<i>T. cruzi</i>	Humano
Hohemí	Bogotá	(5)	LIT	<i>T. cruzi</i>	Humano
Choachí	San Agustín, Cundinamarca		LIT	<i>T. rangeli</i>	Humano
Perija	Perijá, Guajira		LIT	<i>T. rangeli</i>	Rhodnius sp.
P19	Tibú, Norte de Santander		LIT	<i>T. rangeli</i>	Humano
San Agustín	San Agustín, Cundinamarca		LIT	<i>T. rangeli</i>	Humano

- 1: Instituto Nacional de Salud
- 2: Universidad de Antioquia
- 3: Fundación CIDEIM
- 4: CINTROP - Universidad Industrial de Santander
- 5: Universidad de los Andes

Extracción de ADN

Se probaron tres métodos de extracción:

Ebullición : 20 ul de parásitos de cultivo se mezclaron con 180 ul de agua destilada. Las muestras se hirvieron durante 10 minutos y se centrifugaron 10 min (14.000g; Beckman microfuge II). Se utilizó 1 ul del sobrenadante para PCR.

GeneClean: se hizo extracción de ADN a partir de 200 ul de parásitos de cultivo por absorción sobre perlas de vidrio, como se describe por la casa comercial Bio 101 (San Diego, CA, E.U). El ADN se liberó en 200 ul de agua bidestilada y se utilizó 1 ul para PCR.

Lisis hipotónica: 20 ul de parásitos de cultivo se centrifugaron 10 segundos a máxima velocidad. El botón de parásitos se mezcló con 200 ul de agua destilada y se utilizó 1 ul para PCR.

Además se utilizaron células enteras adicionando 1 ul del cultivo directamente a la reacción de PCR.

PCR

Se amplificaron las muestras en un volumen de 25 ul. Las soluciones tampones y los ciclos de temperatura se usaron como lo describen Murthy *et al.*(3).

Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó la electroforesis (70 voltios, 1 hora) de 10 ul del producto amplificado en un gel de 1,5% agarosa en buffer TAE 1X: 4mM tris-base, 2mM ácido acético, 0,1mM EDTA pH 8.0. El ADN se visualizó coloreando el gel en 0,5 ug/ml de bromuro de etidio durante 5 minutos y 15 minutos de lavado en agua destilada. El registro fotográfico se hizo con película Polaroid 665.

Southern blotting o transferencia

Se hicieron réplicas dobles del gel sobre membranas de Nylon (Nytran, Schleicher & Schuell y Hybond, Amersham International) utilizando la técnica de transferencia bidireccional (4).

La confirmación de la identidad de los productos de PCR se realizó con sondas de ADN no

radioactivas (Genius, Boehringer Mannheim; kit de detección de ADN marcado no radioactivamente, cat No.1093657).

Hibridación

Sondas intergénicas específicas para productos de PCR de *T. cruzi* y *T. rangeli* (3) fueron marcadas con digoxigenina dUTP en una reacción hexamero-priming. La hibridación se llevó a cabo como la describen Murthy *et al.*, (3); sin embargo, los lavados finales se hicieron en 0,1 X SSC a 45°C. Los resultados se visualizaron con la reacción de color del NBT.

RESULTADOS

Murthy *et al.*, (3) han propuesto que el producto de amplificación de los genes mini-exón de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* podrían utilizarse para distinguir estos dos protozoarios.

Como los experimentos de Murthy *et al.*, (3) se realizaron con muestras de ADN purificado, nosotros llevamos a cabo experimentos preliminares para determinar el método óptimo para la preparación de muestras. Cuatro métodos de extracción de ADN fueron comparados (tabla 2), utilizando parásitos provenientes de cultivo:

TABLA 2. Reacción de PCR con los diferentes medios

Método de extracción	NNN	NNN más	LIT
Ebullición	Negativo	Negativo	Positivo
GeneClean	Negativo	Negativo	Positivo
Lisis hipotónica	Nd	Nd	Negativo
Células enteras	Negativo	Negativo	Negativo

Positivo= Se obtuvo producto de amplificación con cada una de las cepas probadas.

Negativo = No se obtuvo producto de amplificación con ninguna de las cepas probadas.

Nd= No determinado.

Se adoptó como procedimiento estándar el método de lisis por ebullición debido a la reproducibilidad de los resultados, sencillez y bajos costos de la técnica. Este método funcionó bien para los parásitos cultivados en medios que no contenían sangre total (Lit, Schneider); aquellos que contenían sangre inhibieron la reacción de PCR. Sin embargo, los inhibidores fueron fácilmente eliminados lavando las células tres veces con medio LIT. Como la reacción de PCR fue negativa al utilizar lisis hipotónica de parásitos cultivados en LIT (es el medio convencional utilizado por nosotros para cultivar tripanosomas), se decidió no evaluar esta metodología de extracción con los otros medios de cultivo. Nosotros creemos que la lisis hipotónica no es un procedimiento de lisis lo suficientemente riguroso para liberar el ADN de la célula.

Los resultados de los ensayos se muestran en la figura 1. Los productos de amplificación por PCR de *T. cruzi* (línea 2) y *T. rangeli* (línea 1) son de 0,6 y 0,8 Kb respectivamente, cuando son separados en un gel de agarosa 1,5% visualizado con bromuro de etidio. La confirmación de la identidad del producto de amplificación se obtuvo hibridizándolo con una sonda específica de especie (3) marcada con digoxigenina (figura 2).

En algunos casos, el producto de amplificación fue muy tenue o no se observó en el gel (figura 2A línea 8). La identificación positiva de estos productos se logró mediante la hibridización con la sonda marcada (figura 2B líneas 5,6; 2C línea 8).

La tabla 3 presenta un resumen de los resultados de las cepas analizadas. De 28 muestras provistas por los participantes, 17 muestras caracterizadas fueron identificadas correctamente. En una muestra, No. 13, el ensayo de PCR no estuvo de acuerdo con la identificación original de la muestra. De cinco muestras no caracterizadas previamente, 3 fueron identificadas como *T. cruzi* y y dos como infecciones mixtas (incluyendo una muestra proveniente de un perro que

tenía título de anticuerpos contra *Leishmania*). Como el control negativo en este experimento fue negativo, nosotros creemos que este resultado representa una verdadera infección mixta. No se pudo obtener producto de amplificación positivo de dos muestras. En el caso de la No. 25 se debió a sobredilución de la muestra de glándula salivar y en el de la No. 18 que no se observaron parásitos viables en el cultivo.

Finalmente, dos muestras (No. 26 y No. 27) fueron positivas para ambos *T. cruzi* y *T. rangeli*, esto pudo ser debido a contaminación en la reacción de PCR, dado que el control negativo también mostró un producto de amplificación de *T. cruzi* para este experimento en particular.

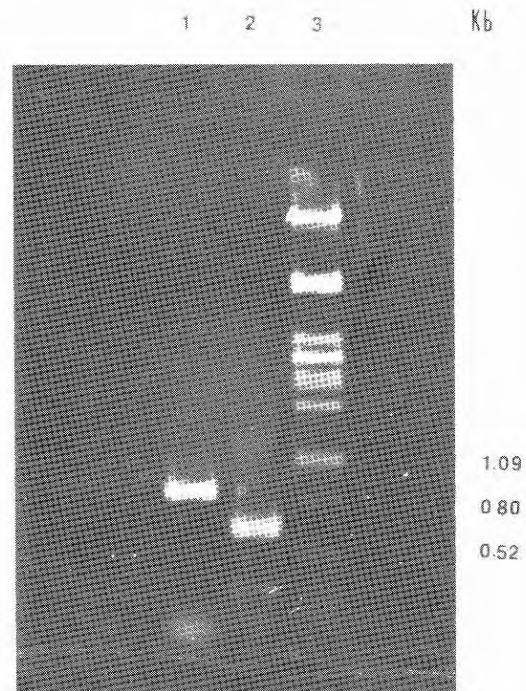


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR de *T. rangeli* 0,8 Kb (línea 1) y *T. cruzi* 0,6 Kb (línea 2). El marcador de peso molecular (línea 3) es el fago lambda cortado con la enzima de restricción Pst1.

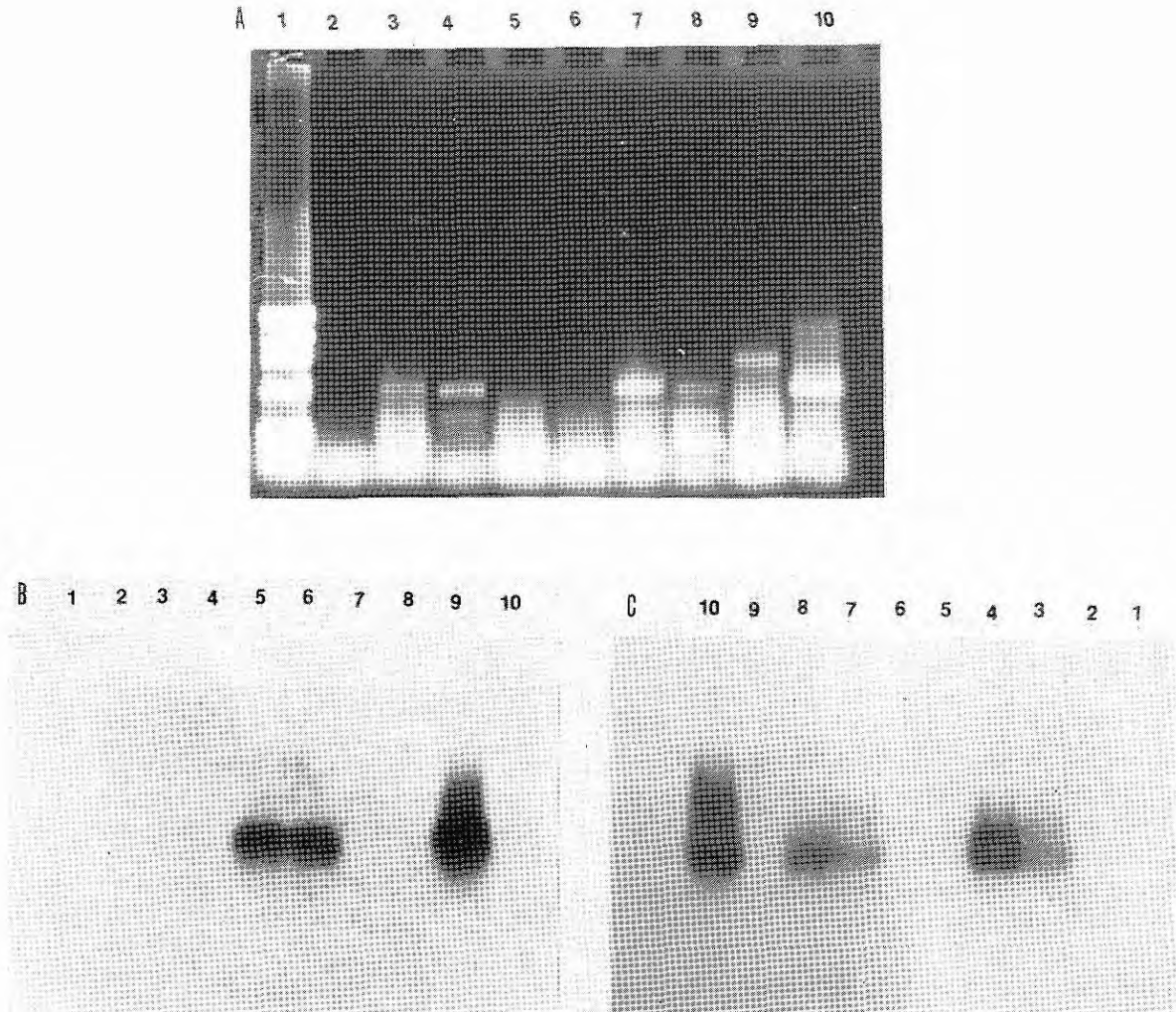


Figura 2. Análisis de transferencia de productos de PCR del mini-exón de *T. cruzi* y *T. rangeli*. A. Coloración con bromuro de etidio de los productos de PCR corridos en un gel de agarosa 1,5%. Cepas de *T. rangeli* J1, J2, LDG (líneas 5, 6, 9). Cepas de *T. cruzi* (líneas 3, 4, 7, 8, 10) Control de reacción (línea 2) B. Hibridación con la sonda específica de *T. rangeli*. C. Hibridación con la sonda específica de *T. cruzi*.

DISCUSION

De un grupo de 28 muestras de *T. cruzi* o *T. rangeli* no probadas anteriormente por PCR, logramos identificaciones positivas en 26 de las muestras. El ensayo de amplificación por PCR prueba ser una adición útil a la técnicas de rutina para detectar y diagnosticar la enfermedad de Chagas en laboratorios colombianos.

Ciertos resultados justifican más discusión

En el caso de la falta de detección de *T. rangeli* en un extracto de glándulas salivares del vector, nosotros sugerimos que la muestra estaba muy diluída y no contenía parásitos. Teóricamente, se deben detectar los tripanosomas por PCR si estos han sido observados bajo el microscopio. Este experimento se repetirá con un volumen más pequeño de medio LIT en la suspensión de las glándulas salivares aisladas.

TABLA 3. Cepas analizadas

Muestra	IDENTIFICACION		ENSAYO DE PCR	
	Cepa	<i>Cruzi</i> / <i>Rangeli</i>	Bromuro de etidio	Transferencia
1	San Agustín ¹	R	R	R
2	Sylvio ¹	C	C	C
3	CP1	C	C	-2
4	FX17	C	C	C
5	SC1	C	C	C
6	J1	R	-	R
7	J2	R	-	R
8	SV5	C	C	C
9	Mery Suárez	C	C	C
10	LDG	R	R	R
11	STP31	C	C	C
12	Nohemí	C	C	C
13	P19	R	C	C
14	Perijá (cultivo)	R	-	R
15	Atanasio	C	?	C
16	Miguel	C	C	C
17	Gonzalo	C	C	C
18	Marina	C	-	-
19	MRAT/530	U	C	C
20	MDID No 3	U	C	C
21	C23	R	R	R
22	Fredy Chaparro	C	C	R+C
23	Guateque	C	C	C
24	MDID R/12	U	C	C
25	Pito-g.salival(Perijá)	R	-	-
26	Choachí	R	C	C+R ³
27	San Agustín	R	C	C+R ³
28	T328 (<i>Didelphis</i>)	U	C	C+R
29	RSUB	R	R	R
30	334 (perro)	L?	C	C

C= *T. cruzi*; R= *T. rangeli*; U= no caracterizado; L?= Suero positivo para *Leishmania*.

- No detectado

? Producto de PCR de 0,45 Kb de origen desconocido, posiblemente derivado de *L. chagasi* o *Endotrypanum schaudinni* (observaciones no publicadas de O. Fernández y D.A.C).

1 Muestras controles de UCLA.

2 El lavado de la hibridización con la sonda fue muy restringente.

3 Contaminación del *stock* o reacción de PCR.

Tres muestras (No.6, No. 7, No.14) no presentaron productos de amplificación en la coloración con bromuro de etidio, aunque fueron positivas por hibridización. Estas tres muestras fueron de *T. rangeli*, lo cual sugiere que bajo condiciones no óptimas el gen de *T. rangeli* no puede amplificarse eficientemente. Cambios en el perfil de temperaturas del ciclador pueden incrementar la eficiencia de la amplificación.

Dos muestras (No. 26, No. 27) presentaron productos de amplificación característicos tanto de *T. cruzi* como de *T. rangeli*. El control negativo muestra que este resultado se debió a contaminación con un producto de PCR para *T. cruzi*, evento que ocurre con gran facilidad. Esta experiencia también resalta la necesidad de incluir controles negativos en cada experimento y tomar precauciones para eliminar fuentes de contaminación.

La muestra No. 13 identificada originalmente como *T. rangeli* mostró un producto de amplificación característico de *T. cruzi*. Este resultado resalta problemas adicionales asociados con la identificación de parásitos: cultivos mezclados, confusión en la marcada de muestras y/o contaminación de stocks.

En la muestra No. 15 se obtuvo un producto de PCR (0,45 Kb) menor que el producto de amplificación para *T. cruzi* o *T. rangeli* que no hibridizó con las respectivas sondas. En la misma muestra un producto de PCR de 0,6 Kb hibridizó con la sonda de *T. cruzi* sugiriendo que el cultivo tenía una mezcla de poblaciones, una de las cuales es *T. cruzi*.

El producto de 0,45 Kb no se ha caracterizado; sin embargo, los protozoarios cinetoplastidos del nuevo mundo *L. chagasi* y *Endotrypanum schaudinni* poseen genes mini-exon de este tamaño (observaciones no publicadas de O. Fernandez y D.A.C) y son por consiguiente candidatos para contaminantes a nivel celular. La hibridación con una sonda específica será necesaria para confirmar la identidad de otro tipo de célula en esta muestra.

En futuras evaluaciones, se propone aumentar el número de cepas para analizar por esta

técnica y aumentar el rendimiento del producto de PCR de muestras crudas. Esta será una manera segura de incrementar el nivel de confianza en la identificación. Además, esperamos implementar PCR en laboratorios colombianos, para la identificación de tripanosomas como una técnica primaria o como medio para resolver ambigüedades que surjan de las técnicas de diagnóstico de rutina.

SUMMARY

This workshop on the use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect and differentiate *T. cruzi* and *T. rangeli* had as its main purpose the transfer of this technology to laboratories in Colombia. To demonstrate this technique, we used clinical samples or isolates obtained from endemic areas of Colombia.

In order to evaluate the possible effect of different culture media components on the sensitivity of PCR, analyses were performed on trypanosomes that were grown in different culture media. The DNA was extracted from these cells by boiling, GeneClean, and hypotonic lysis. The DNA was amplified using a conserved 22 synthetic oligonucleotide sequence within the tandemly repeated mini-exon gene from *T. cruzi* and *T. rangeli*. The two organisms were distinguished by the electrophoretic mobilities of their respective amplification products. The confirmation of the identity of the PCR products was obtained using species-specific probes from intergenic regions. Hybridisation was visualised by the NBT colour reaction.

From a total of 28 samples analysed, 17 identifications were in agreement with their prior identification. From 5 unknown samples, three were identified as *T. rangeli* and two as mixed infections. We obtained only two ambiguous identifications caused by contamination in samples or PCR reaction. Only two samples could not be identified by PCR because of DNA extraction problems.

The results from this workshop support the potential of the PCR technique as a useful additional tool for the detection and diagnosis of Chagas' disease in Colombia.

REFERENCIAS

1. **Lemesre JL, Afchain D, Orozco O.** Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi* specific monoclonal antibody. Am J Trop Med Hyg 1986; 35: 86.
2. **Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, et al.** Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. Parasitol 1987; 94:475.
3. **Murthy VK, Dibbern KM, Campbell D.** PCR amplification of miniexon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. Mol Cell Probes 1992; 6:225.
4. **Smith GE, Summers MD.** The bidirectional transfer of DNA and RNA to nitrocellulose and diazobenzyloxy methyl-paper. Annal Biochem 1980; 109:123.