

Nº 49, Abril/1999, p. 1-5

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO *Trypanosoma vivax* ISOLADO NO PANTANAL DO ESTADO DE MATO GROSSO E O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA INFECÇÃO POR *Trypanosoma evansi* PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Cláudio R. Madruga¹
Subbash Morzaria²
Phelix O. Majiwa²

Trypanosoma vivax foi introduzido na América do Sul no século passado. A prevalência é variável em diversos países deste continente, onde ocorrem surtos esporádicos e perdas econômicas consideradas importantes. No Brasil, *Trypanosoma vivax* foi diagnosticado pela primeira vez no Estado do Pará em 1972, infectando búfalo. Até recentemente, a incidência desse hemoprotozoário estava restrita à região Norte do País. Entretanto, este hemoparasito foi diagnosticado, em 1995, infectando um rebanho bovino em Poconé, região do Pantanal do Estado de Mato Grosso, cujos sintomas principais eram anemia, conjuntivite, disenteria, aborto e morte. Posteriormente, a infecção por este agente etiológico foi diagnosticada em outras regiões do Pantanal. Portanto, é necessário um estudo epizootiológico para obtenção de dados para avaliar os riscos da incidência, efeito na produtividade e impacto econômico na bovinocultura da região. Para alcançar esses objetivos, as técnicas de diagnóstico são fundamentais. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos existentes, aglutinação em cartão, imunofluorescência indireta e imunoabsorção enzimática, apresentam reação cruzada com *T. evansi*, embora neste último teste ocorra em menor percentagem. Por outro lado, as técnicas de diagnóstico direto como a de microhematócrito ou técnica de Woo e imunoabsorção enzimática para detecção de antígenos de *Trypanosoma* apresentam baixa sensibilidade, apesar da alta especificidade. A alternativa é a reação em cadeia da polimerase (PCR) que possui

¹ Méd.-Vet., Ph.D., CRMV-MS Nº 0587, Embrapa Gado de Corte, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS, Brasil.

² International Livestock Research Institute (ILRAD), P.O. Box 30709, Nairobi, Kenia.

elevados índices de sensibilidade e especificidade. O objetivo deste trabalho foi identificar o gene que codifica uma proteína solúvel de 8 kDa de *T. vivax* no isolado obtido de uma vaca nelorada com sintomas clínicos de tripanossomíase no surto ocorrido em Poconé, Pantanal de Mato Grosso. Este gene possui múltiplas cópias repetidas em tandem no genoma do *T. vivax*, na maioria dos isolados analisados até o presente. Entretanto, existe isolado com menor número de cópias deste gene ou com divergência genética, o que resulta numa amplificação insatisfatória para a utilização dessa PCR como diagnóstico. O segundo objetivo foi verificar a formação do produto de 1,5 kb com *primers* para o subgênero *Trypanozoon* que inclui *T. evansi*, com a finalidade de estabelecer um PCR múltiplo que possa realizar um diagnóstico diferencial de *T. vivax*. Na caracterização do gene que codifica a proteína solúvel de *T. vivax* e PCR, foram utilizados DNA do isolado do Pantanal de Poconé, Estado de Mato Grosso (CNPGPCPPTV01) e do clone ILDat1.2 originário de isolado do Oeste da África. A PCR para *T. vivax* empregou os *primers* ILO1264, de seqüência de bases CAG CTC GCC GAA CAC TTG GCT GGG e ILO1265 TCG CTA CCA TCG CAA TCG TCG TCT CAA GG. A reação de amplificação foi realizada num volume de 20 microlitros utilizando 50 nanogramas de *primers*, 250 µM de cada dNTPs e três unidades de *Thermus aquaticus* DNA polimerase. O termociclador foi programado para 92°C, 1 minuto (desnaturação), 55°C, 1 minuto (alinhamento) e 72°C, 1 minuto (extensão) por 30 ciclos. Cinco microlitros da reação foram colocados em gel agarose 1%, para eletroforese e corados com brometo de etídio, e as bandas visualizadas em luz ultravioleta e fotografadas em filme polaróide. Os produtos da PCR e DNA genômico foram transferidos para membrana de nitrocelulose *slots blots* e hibridizados com o plasmídeo pgDSIL-800/2/1 marcado com ³²P. Adicionalmente, o DNA genômico sofreu digestão com a enzima de restrição Sau3A e foi colocado para eletroforese em agarose 0,8% e corado com brometo de etídio para fotografia. Na seqüência, o DNA do gel foi desnaturado, neutralizado e transferido para uma membrana de náilon. A hibridação desta membrana foi também realizada com pgDSIL-800/2/1 marcado com ³²P. Na PCR para *T. evansi*, foram utilizados os seguintes *primers*: ILO342 GAT CCG CAG CCG GGC CTG e ILO343 CCG CGG TGG CTC CTT CCC. As condições da reação de PCR foram idênticas às empregadas para o DNA de *T. vivax*. A PCR, tanto do DNA genômico do isolado brasileiro de *T. vivax* como do clone ILDat1.2, amplificou um produto de, aproximadamente, 400 pb. Houve hibridação tanto do DNA genômico quanto do produto da PCR com a sonda utilizada (Figs. 1 e 2). A hibridação do DNA genômico digerido por Sau3A apresentou igual tamanho

de bandas entre os organismos de *T. vivax* estudados (Fig. 3). A amplificação por PCR do DNA genômico do isolado de *T. evansi* resultou num produto de cerca de 1,5 kb, típico do subgênero *Trypanozoon*. Com base nos resultados obtidos, infere-se que o isolado de *T. vivax* da região de Poconé possui o gene que codifica o antígeno solúvel de *T. vivax* e que sua organização genômica é similar ao do clone do Oeste da África. Portanto, os *primers* desenvolvidos no International Livestock Research Institute são apropriados para amplificação de DNA do isolado da região do Pantanal do Brasil, como foi demonstrado pelo resultado da PCR. Os *primers* utilizados para o subgênero *Trypanozoon* apresentaram também resultados positivos. Portanto, foi possível desenvolver uma reação de PCR múltipla para o diagnóstico diferencial das infecções por *T. vivax* e *T. evansi* (Fig. 4). A próxima fase será a determinação da sensibilidade desta PCR, para utilizá-la como diagnóstico.

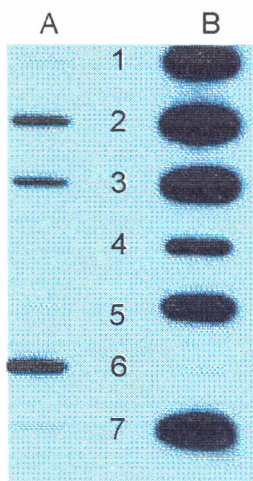


FIG. 1. Hibridação do produto de DNA genômico (A) e PCR (B) e de *Trypanosoma vivax* com plasmídeo pgDSIL-800 2/1, marcado com ^{32}P . Linha A DNA genômico, 1A-5A isolado brasileiro de *T. vivax*. 6A controle positivo clone ILDat1.2, 7A *T. evansi*. Linha B Produto do PCR, 1B-5B isolado brasileiro, 6B controle negativo *T. evansi*, 7B controle positivo ILDat1.2.

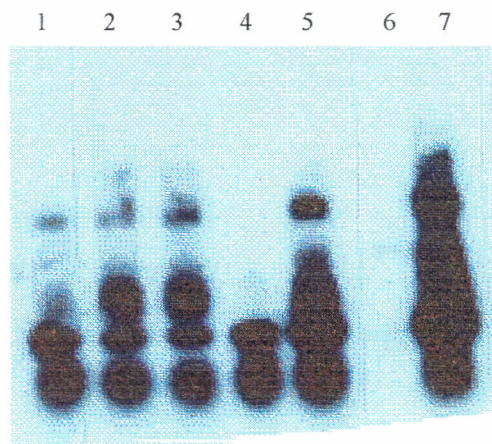


FIG. 2. Hibridação do produto da PCR para *Trypanosoma vivax* com plasmídeo pgDSIL800/2/1 marcado com ^{32}P , contendo o gene que codifica o antígeno solúvel deste hemoprotozoário. Linha 1-5 DNA do isolado da região do Pantanal, linha 6, controle negativo, linha 7 controle positivo ILDat1.2.

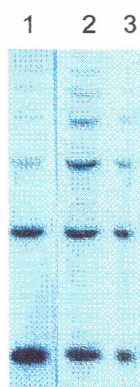


FIG. 3. Southern blot e hibridação com pgDSL1-800/2/1 marcado com ^{32}P do DNA do clone ILDat 1.2 do Oeste da África e isolado do Pantanal do Brasil digerido por Sau3A. Linha 1, ILDat1.2, linhas 2 e 3 isolado do Pantanal.

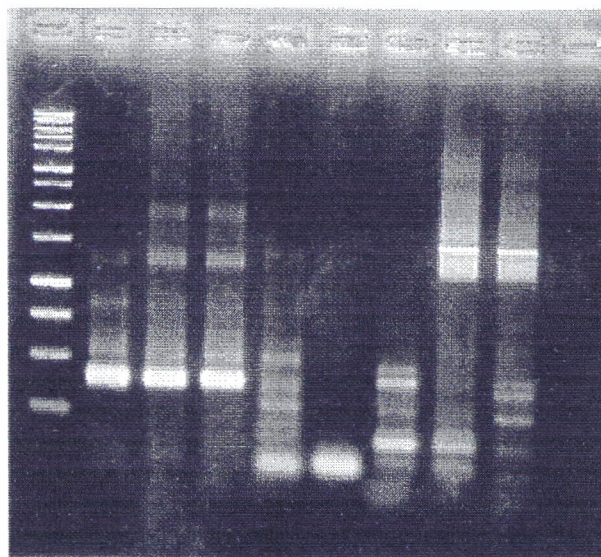


FIG. 4. PCR múltipla para detecção de DNA de *Trypanosoma vivax* e *T. evansi*. Linha 1 marcador de peso molecular, linha 2 controle positivo ILDat1.2, linhas 3, 4 isolado do Pantanal, linha 5 isolado brasileiro com *primers* para *Trypanozoon*, linha 6 ILDat1.2 com *primers* para *Trypanozoon*, linha 7 *T. evansi* com *primers* para *T. vivax*, linha 8 *T. evansi*, linha 9 *T. brucei*, linha 10 controle negativo sem DNA de *Trypanosoma*.

Tiragem: 50 exemplares