

DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA LA DETECCIÓN DE INFECCIONES PRODUCIDAS POR TRYPANOSOMA EN EL GANADO BOVINO.

Gonzalez Lihue

*Laboratorio de Tecnología Inmunológica, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
Director: Iván Bontempi*

Área: Ciencias de la Salud

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis africana es una enfermedad hemoparasitaria de importancia económica que afecta fuertemente al ganado bovino, principalmente en África subsahariana y en el norte de América del Sur, causada por algunas especies del género protozoo Trypanosoma, como el *Trypanosoma evansi* (*T. evansi*) y *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*). En Argentina, la ganadería bovina es una de las principales actividades económicas, donde se cuenta con un stock de 53 millones de cabezas aproximadamente y las pérdidas reproductivas representan una causa sustancial de perjuicio económico (Senasa, 2018).

T. vivax pertenece al subgénero *Duttonella* y causa predominantemente una enfermedad consuntiva del ganado (Mekata y col., 2009). Es la especie más patógena y puede producir signos clínicos de infección como fiebre intermitente, anemia, aborto, apatía, anorexia, disminución de la producción de leche, pérdida progresiva de peso y ocasionalmente la muerte en el 50% de los animales no tratados (Duenez y col., 2017). Un estudio reciente reportó por primera vez la presencia de *T. vivax* en el norte de Argentina, generando una alerta a los entes encargados del relevamiento y control sanitario de nuestro país (Paoletta y col., 2018).

T. evansi es principalmente un parásito sanguíneo, aunque también se encuentra en fluidos extravasculares (Eberhardt y col., 2014), perteneciente al subgénero *Trypanozoon*, y causa una enfermedad consuntiva denominada Surra o mal de caderas, grave para el ganado y los animales salvajes. Esta enfermedad es endémica en el sudeste de Asia, África y América del Sur. Los efectos patogénicos de *T. evansi* son similares al del *T. vivax* pudiendo ocasionar también la muerte (Mekata y col., 2009).

Los métodos parasitológicos directos para diagnóstico de tripanosomas y otros hemoparásitos, tienen limitaciones para detectar parasitemias bajas, especialmente en infecciones crónicas o en los casos donde el tratamiento no realizó una correcta esterilización (Cassalett B y col., 2011). La biología molecular proporciona herramientas para el diagnóstico sensible y específico basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este contexto, en el presente trabajo se plantea realizar una puesta punto de una reacción en cadena de la polimerasa para la detección del género Trypanosoma, y las especies *T. evansi* y *T. vivax* a partir de cepas de referencias. Además, se planteará la genotipificación de muestras de sangre de bovinos provenientes de tambos de la provincia de Santa Fe, que han sido diagnosticados con Tripanosomiasis positiva mediante la técnica de Woo.

Título del proyecto: Desarrollo de una técnica de diagnóstico molecular para la detección de infecciones producidas por Trypanosoma en el ganado bovino.

Instrumento: Plan de Tesina

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: No posee

Proyecto en el que se enmarca el trabajo: Proyecto de tesina, resolución CE2018-06 Acta 04/18

Director: Iván Bontempi

Fecha de presentación y/o evaluación: 15 de junio de 2018

OBJETIVOS

Objetivo general:

Desarrollar un método de diagnóstico molecular en bovinos para infecciones con *Trypanosoma* y que pueda diagnosticar las especies *Trypanosoma vivax* y *Trypanosoma evansi*, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Objetivos particulares:

1. Optimización de las condiciones para aumentar la sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR para amplificar *Trypanosoma*, *T. vivax* y *T. evansi*.
2. Desarrollo de una PCR múltiple para la detección simultánea de *T. vivax* y *T. evansi*.
3. Evaluación de la técnica de diagnóstico molecular desarrollada, en muestras de sangre de bovinos de tambos donde se diagnosticaron previamente casos con Trypanosomiasis.

MATERIALES Y MÉTODOS

En primer lugar, se puso a punto la técnica de PCR para la detección de los distintos *Trypanosomas*. Se realizaron las reacciones bajo diferentes condiciones que permitieron obtener un programa de ciclado y condiciones de reacción óptimas para la detección. Las cepas de referencias empleadas fueron la Y486 para *T. vivax* y la Vaimaca para *T. evansi*. Se realizaron diluciones del ADN de las cepas de referencia durante la reacción de PCR para determinar la sensibilidad, optimización de los tiempos de las distintas etapas del ciclado y optimización de la temperatura de anillado. También se realizó una PCR múltiple con la finalidad de amplificar en una misma reacción de PCR los productos correspondientes a *T. vivax* y *T. evansi*. También, se utilizó un gen reportero específico para la especie bovina (*Bos primigenius taurus*), el gen del Citocromo B de *B. primigenius*, que nos permite corroborar la integridad y calidad del ADN obtenido de las muestras de sangre evaluadas.

El programa de termociclador para detectar *Trypanosoma* es de 35 ciclos de 1 minuto, 1:30 minutos y 2 minutos. Los oligonucleótidos empleados son: 18ST nF2 y 18ST nR3 con una temperatura de anillado (T_a) de 58°C (Geysen y col., 2003)

El programa de termociclador para *T. vivax*, *T. evansi* y Citocromo B es de 35 ciclos de 1 minuto para las 3 etapas. Los oligonucleótidos empleados son:

Para Citocromo B: Forward: 5'- CCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3', Reverse; 5'-CCA TCCAACATCTCAGC ATGATGAAA-3' con una T_a de 60°C.

Para *T. vivax*: DTO155 y TviCatL1 con una T_a de 65°C.

Para *T. evansi*: ESAG6 y ESAG7 con una T_a de 55°C (Duenez y col., 2017).

La PCR fue de 25 μ l, y contenía Buffer de GoTaq 1X, dNTP 0,25 μ M, MgCl₂ 1,5 μ M, oligonucleótidos 0,2 μ M, polimerasa Taq 1,2 U (GoTaq, Promega). Luego, estos productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 100 V por 20 minutos, se tiñeron con GelRed TM y se visualizaron bajo luz ultravioleta. Para el caso de la PCR múltiple, los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 100 V por 30 minutos. Para la evaluación de la técnica desarrollada en las muestras de bovinos, las mismas se obtuvieron de diferentes tambos del departamento San Cristóbal de la provincia de Santa Fe, donde se diagnosticó al menos un sujeto con trypanosomiasis positiva por la técnica de hematocrito (Woo). Para la purificación de las muestras, primero se mezcló un volumen de sangre fresca con una solución de Guanidina-EDTA 6 M, y luego se realizaron extracciones de ADN utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit según las instrucciones del fabricante.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Optimización de la PCR para *Trypanosoma*, *T. vivax* y *T. evansi*.

Se evaluaron distintas temperaturas de anillado: 58°C, 62°C y 65°C para *T. vivax* y 55°C, 58°C y 62°C para *T. evansi*. En todas las condiciones se amplificó los fragmentos correspondientes a cada parásito. También se evaluaron dos programas de ciclado diferentes:

Primero 1 min. a 94°C, 1 min. a 58°C y 1 min. a 72°C

Segundo 1 min. a 94°C, 40 seg. a 58°C y 30 seg. a 72°C.

Para esto se emplearon distintas concentraciones de ADN de la cepa de referencia Y486 y Vaimaca y se determinó el límite de detección de la técnica. Las concentraciones fueron:

Para *T. vivax*: 0,5 a 0,000005 ng/μl para ambos programas. Para *T. evansi*: 1,75 a 0,0000175 ng/μl. Para ambos parásitos se obtuvo una mayor sensibilidad con el primer programa, y se logró detectar hasta una concentración de ADN inicial de 0,005 ng/μl y 0,0000175 ng/μl para *T. vivax* y *T. evansi* respectivamente.

Para *Trypanosoma* también se evaluaron 2 programas distintos:

Primero 1 min. a 94°C, 1:30 min. a 58°C y 2 min. a 72°C.

Segundo 1 min. a 94°C, 40 seg. a 58°C y 1 min. a 72°C

Para ambos programas se empleó la misma concentración de ADN de la cepa Y486, obteniéndose una mayor sensibilidad para el primer programa.

PCR múltiple

Se realizó una PCR múltiple para poder amplificar los productos de *T. evansi* y *T. vivax* en una sola reacción. Se pudo separar y diferenciar correctamente ambos fragmentos como se puede observar en la imagen 1.



Imagen 1: PCR múltiple de *T. vivax* y *T. evansi*.

1: Amplificación de *T. vivax* de 177 pb,

2: Amplificación de *T. vivax* y *T. evansi*,

3: Amplificación de *T. evansi* de 237 pb.

4. Marcador de peso molecular de 100 pb

Evaluación de la técnica de PCR múltiple en muestras de bovinos

Las muestras evaluadas se dividieron en distintos grupos de acuerdo a sus características. El **Gr I**, n=17, se obtuvieron de tambos donde había presencia de vacas infectadas con trypanosomas; el **Gr N**, n= 9, se obtuvieron de tambos donde no había presencia de vacas infectadas; y el **Gr T**, n= 9, muestras que corresponden a vacas que estuvieron infectadas y fueron tratadas con antiparasitarios. De todas estas muestras se evaluó la presencia de Citocromo B, *Trypanosoma*, *T. vivax* y *T. evansi*. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Algunos de los resultados obtenidos se pueden ver en la imagen 2.

En este trabajo se optimizó una técnica de diagnóstico de *Trypanosoma* mediante biología molecular, empleando un gen reportero para corroborar una correcta purificación de ADN. Además se desarrolló un PCR múltiple para diagnosticar *T. vivax* y *T. evansi* simultáneamente. De la evaluación de muestras de bovinos de zonas bajo sospecha de infecciones por

tripanosomiasis, se determinó que los bovinos estaban infectados con el parásito *T. vivax* en un 76% de los casos. Además, se observó la presencia de infecciones recurrente pos tratamiento en bovinos que habían sido diagnosticadas positivas pero que luego se volvieron negativas mediante la técnica de Woo. Esta técnica permitió diagnosticar a bovinos de tambos de la provincia de Santa Fe, los cuales no contaban con una técnica que pudiera determinar la especie del parásito. Si bien se reportó la presencia de *T. vivax* en el norte de Argentina (Paoletta y col., 2018), hasta ahora no había registros de la presencia de este parásito en la provincia de Santa Fe.

	Gr N	Gr I	Gr T	Total
Ctr B	9/9 (100%)	17/17 (100%)	9/9 (100%)	35/35 (100 %)
<i>T. vivax</i>	0/9 (0%)	13/17 (76%)	1/9 (11%)	14/35 (40%)
<i>T. evansi</i>	0/9 (0%)	0/17 (0%)	0/9 (0%)	0/35 (0 %)
Trypanosoma	0/9 (0%)	13/17 (76%)	1/9 (11%)	14/35 (40%)

Tabla 1: Resultados de PCR (+) para cada diagnóstico, representados por grupo

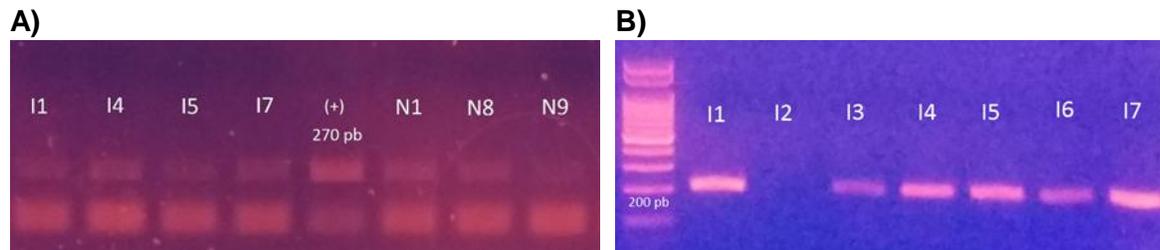


Imagen 2: A) PCR para detectar ADN Bovino: Las muestras I1, I4, I5, I7, N1, N8 y N9 amplificaron una banda específica de 270 pb. B) PCR múltiple para detectar *T. vivax* y *T. evansi*: Las muestras I1, I3, I4, I5, I6 e I7 amplificaron específicamente para *T. vivax* con una banda de 177 pb.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Cassalett B., Julio V., Parra A., Baldrich F.,** 2011. Diagnóstico y caracterización molecular de infecciones naturales por *Trypanosoma* spp. en bovinos de la Orinoquía Colombiana. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, 12, 86-91.
- Duenez J., Chávez O., Jaramillo AM.,** 2017. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. Ticks and Tick borne Diseases, 8, 290–299.
- Eberhardt AT., Monje LD., Zurvera DA., Beldomenico P.,** 2014. Detection of *Trypanosoma evansi* infection in wild capibaras Argentina using smear microscopy and real-time PCR assays. Parasitol, 202, 226-233.
- Geysen D., Delespaux V., Geerts S.,** 2003. PCR–RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. Veterinary Parasitology, 110, 171–180.
- Mekata H., Konnai S., Witola W., Inoue N., Onuma M., Ohashia K.,** 2009. Molecular detection of trypanosomes in cattle in South America and genetic diversity of *Trypanosoma evansi* based on expression-site-associated gene 6. Infection Genetics and Evolution, 9, 1301–1305.
- Paoletta MS., López AL., de la Fournière S., Guillemi EC., Luciani C., Sarmiento NF., Mosqueda J., Farber MD., Wilkowsky SE.,** 2018. Epidemiology of Babesia, Anaplasma and *Trypanosoma* species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. Ticks and Tick borne Diseases, 9, 155-163.
- Senasa,** 2018. <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/bovinos/informacion/informes-y-estadisticas>