

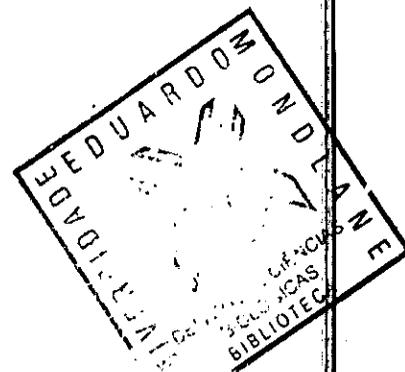
BLO-219

ECP, DI J. SAIDE



Universidade Eduardo Mondlane
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

Trabalho de Culminação de Estudos



Aplicação do PCR para a Detecção de *Trypanosoma congolense* e *T. vivax* no Diagnóstico Molecular da Tripanossomose Bovina

Autora:

Paula Alberto Macucule



Universidade Eduardo Mondlane
Faculdade de Ciências
Departamento de Ciências Biológicas

Trabalho de Culminação de Estudos

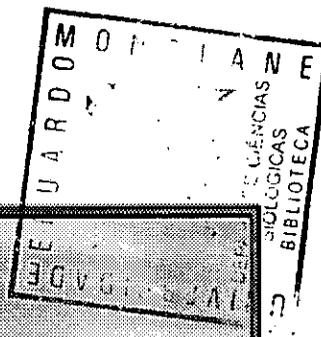
**Aplicação do PCR para a Detecção de *Trypanosoma congolense* e *T. vivax* no
Diagnóstico Molecular da Tripanossomose Bovina**

Supervisores:

Dr^a Cristina Beatriz

Prof. Dr. Luís Neves

Maputo, Dezembro de 2006



AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Alberto Macucule e Celina Magaia; aos meus irmãos: Rabeca e esposo, Sónia e esposo, Jaime e esposa, Joana, Teresa e Fernando; aos meus sobrinhos: Selito, Leila, Umil e Daniela, pelas pessoas que são, que me tornaram o que fui ao longo da formação e o que sou ao longo da vida com seus conselhos úteis e muito mais.

Agradecimentos especiais aos meus supervisores Prof. Dr. Luís Neves e dr^a Cristina Beatriz, pelo apoio, acompanhamento, transmissão de conhecimentos confiança e paciência que me prestaram durante a concretização do presente trabalho.

À Dr^a Dácia Correia pela pronta disponibilidade, no acompanhamento da execução do presente trabalho.

À eng^a Ivone Muocha, à Dr^a Olívia Pedro e ao dr^a Lourenço Mucambo pela pronta disponibilidade, orientação e apoio no aprendizado e execução prática do presente trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Parasitologia da Faculdade de Veterinária, particularmente ao senhor Basílio Flor e à dona Olga pela atenção apoio e ensinamentos prestados

Aos meus amigos e colegas Sónia de Sousa, Cremildo Gomes, Sidónio Mapoissa e muito particularmente à Pércia Banze pelo companhia e ajuda prestada ao longo da formação académica.

Sem poder dirigir agradecimentos de forma individualizada a todos, quero deixar o meu **multíssimo obrigado** a todos que directa ou indirectamente contribuíram para tornar real o presente trabalho.

DECLARAÇÃO DE HONRA

É por minha honra que declaro que o presente trabalho foi por mim realizado, os dados apresentados correspondem aos reais resultados, e que as fontes citadas são realmente as mencionadas.


Paula Alberto Macucule

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho à minha mãe Celina Jaime Magaia, ao meu pai Alberto Macucule Santos Ernesto e a Alberto António Tinga uma das pessoas mais especiais da minha curta vida.

Com muito amor e carinho

RESUMO

A tripanossomose é dos maiores constrangimentos nas actividades agropecuárias baseadas na criação de gado em África. Moçambique é um dos 37 países africanos afectados pela doença. O país faz parte dum vasto território habitado pelas moscas tsetsé (*Glossina* spp) vectores da doença – o cinturão tsetsé. *Glossina* spp transmitem ciclicamente protozoários do género *Trypanosoma*, que são os hemoparasitas patogénicas agentes da doença. Em África ocorrem 11 espécies, sendo que em Moçambique como agentes da tripanossomose bovina ocorrem principalmente as espécies *Trypanosoma congolense* e *T. vivax*.

Para o diagnóstico da tripanossomose são aplicadas várias técnicas que diferem na sensibilidade, facilidade e custo de aplicação, factores que juntamente com o propósito do diagnóstico lideram a escolha da técnica apropriada. Neste âmbito as técnicas de detecção de tripanossomas baseadas no ADN (Hibridação de Ácidos Nucléicos e PCR), surgem como técnicas de alta sensibilidade e especificidade comparativamente a todas outras (parasitológicas, cultura *in-vivo*, detecção de antígenos, sorológicos), sendo por isso recomendadas para estudos epidemiológicos e de tipificação/distribuição.

No presente trabalho foi avaliada a aplicabilidade da PCR no diagnóstico laboratorial de tripanossomose bovina causada por *T. congolense* e *T. vivax* concluindo-se que, a aplicação desta técnica no país deve ser encorajada, ainda que, não de forma rotineira devido aos altos custos, mas sim para estudos específicos. Avaliou-se a performance de *primers* para diagnóstico universal (ITS 1 cf/br) e *primers* para diagnóstico espécie específico (*primers* da PCR Cat L), tendo concluído que os últimos apresentam-se melhores tanto em termos de sensibilidade como em qualidade e quantidade dos amplicons.

Foi ainda avaliada a influência do método de extracção de ADN na performance da PCR relativamente a dois métodos – extracção de sangue total e extracção por fervura de discos de papel de filtro impregnados – tendo concluído que esta última é completamente desaconselhável pois apresenta níveis muito baixos de sensibilidade independentemente do tipo de *primers*, ainda que isto seja mais notório com os *primers* universais.

Através de diluições seriadas do ADN foi avaliada a sensibilidade analítica das PCR não tendo no entanto obtido resultados conclusivos para a PCR ITS 1, enquanto para a PCR Cat L este o foi na diluição 10x do ADN extraído de discos impregnados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Primers* ou oligonucleótidos. 16

Tabela 2: Sistema de quantificação de parasitêmia segundo Paris *et al.* (1982). 17

Tabela 3: Tabela da amostragem de sangue total. 18

Tabela 4: Condições da PCR para amplificação da região ITS1. 20

Tabela 5: Condições da PCR de amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene homólogo ao da Catepsina L dos mamíferos. 21

Tabela 6: Resultados do PCR de amplificação da ITS 1 para os dois métodos de extracção de ADN nas infecções experimentais. 23

Tabela 7: Resultados do PCR Cat L para as infecções experimentais nos dois métodos de extracção de ADN. 26

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1:** Eventos nas três temperaturas básicas da PCR. 11
- Fig. 2:** Produção de novas fitas a partir de um ADN alvo pelo PCR. 13
- Fig. 3:** Gel electroforese de produtos da PCR com *primers* ITS 1cf/br do ADN extraído de sangue total. 24
- Fig. 4:** Gel electroforese de produtos da PCR com *primers* ITS 1cf/br do ADN extraído de discos impregnados pelo método de fervura. 24
- Fig. 5:** Gel electroforese dos produtos da PCR do ADN extraído de amostras de campo, com *primers* ITS 1cf/br. 25
- Fig. 6:** Gel electroforese de produtos da PCR de amplificação do domínio catalítico da proteinases cisteínicas homólogas à Catepsina L dos mamíferos partindo de ADN extraído de sangue total das infecções experimentais. 26
- Fig. 7:** Gel electroforese de produtos da PCR Cat L com ADN extraído de discos impregnados pelo método de fervura. 27
- Fig. 8:** Exemplo de um gel electroforese de produtos da PCR Cat L do ADN extraído de amostras de campo. 27

LISTA DE ANEXOS

- Anexo A:** Classificação de *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma vivax*. i
- Anexo B1:** Distribuição da mosca tse-tse em África – o cinturão tse-tse. i
- Anexo B2:** Mapa representativo da distribuição da tse-tse no Sul de África, e Moçambique em particular. ii
- Anexo C1:** Efectivo bovino e nível de prevalência da tripanossomose em Moçambique. iii
- Anexo C2:** Distribuição do efectivo bovino em Moçambique. iii
- Anexo D1:** Algumas características que juntamente com a morfologia ajudam a identificar o *Trypanosoma congolense* e o *T. vivax* em preparações microscópicas frescas. iv
- Anexo D2:** Morfologia básica dos *Trypanosoma* e morfologia diferencial de *T. congolense* e *T. vivax*. iv
- Anexo E1:** Protocolo do diagnóstico parasitológico da infecção dos murganhos pelo método de Woo. vi
- Anexo E2:** Protocolo da amostragem de sangue total. vi
- Anexo E3:** Protocolo da amostragem de sangue em discos de papel de filtro. vii
- Anexo E4:** Extracção de DNA a partir de sangue total. viii
- Anexo E5:** Extracção de DNA a partir de discos impregnados de sangue. viii
- Anexo E6:** Parasitémias estimadas de acordo com o nível de diluição de ADN. ix
- Anexo F:** Resultados do diagnóstico universal (PCR ITS 1) e espécie-específico (PCR Cat L) em infecções naturais. x

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucléico
AECT	Anion Exchange Centrifugation Test (teste de centrifugação e troca aniónica)
BCM	Buffy Coat Method (métodos de cobertura tampão)
Cat L	Catepsina L
CB-UEM	Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane
DINAP	Direcção Nacional de Pecuária
DSA	Departamento de Sanidade Animal
dNTPs	Desoxinucleótidos
ELISA	Enzyme-linked Immuno - Sorbent Assay (imuno ensaio de enzimas ligadas)
FAO	Food and Agritural Organizsation (organização das nações unidas para a alimentação e agricultura)
HTC	Haematocritc Centrifuge Technique (técnica de centrifugação de hematócrito)
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test (teste de fluorescência indirecta de anticorpos)
ITS	Internal transcribed specer
MINAG	Ministério da Agricultura
NAH	Nucleic-acid hibridisation (hibridação do ácido nucléico)
OIE	Office International des Epizootiesld (Organização Internacional de Saúde Animal)
pb	Par(s) de bases
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição)
rpm	Rotações por minuto
TBE	Tris Borato EDTA
Tris - HCl	Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto
U	Unidades
UV	Luz ultra-violeta

ÍNDICE

Título	Pág.
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1 Diagnóstico da tripanossomose.....	3
2.1.1 Diagnóstico directo	4
2.1.1.1 Técnicas Parasitológicas	4
2.1.1.2 Cultura <i>in vivo</i>	5
2.1.1.3 Detecção de antígenos tripanossómicos.....	6
2.1.2 Diagnóstico indirecto / serológico	7
2.1.3 Diagnóstico molecular baseado no ADN.....	8
2.2 A técnica de PCR na identificação de parasitas e diagnóstico de infecções.....	9
2.2.1 Princípio do método PCR	10
2.2.2 Sensibilidade e especificidade da PCR no diagnóstico de tripanossomose	13
3. Objectivos	14
3.1 Objectivos gerais.....	14
3.2 Objectivos específicos	14
4. Local de realização do estudo	14
5. Material e métodos.....	15
5.1 Material.....	15
5.1.1 Amostras	15
5.1.1.1 Isolados de <i>Trypanosoma congolense</i> e de <i>T. vivax</i>	15
5.1.1.2 DNA de amostras de campo	15
5.1.2 Equipamentos e materiais de laboratório.....	15
5.1.3 Reagentes	16
5.2 Procedimentos.....	17

5.2.1	Diagnóstico pelo método de Woo.....	17
5.2.2	Amostragem do sangue experimentalmente infectado	17
5.2.3	Extracção do ADN.....	18
5.2.3.1	Extracção do ADN do sangue total.....	18
5.2.3.2	Extracção de ADN a partir de papel de filtro impregnado	19
5.2.4	Amplificação do ADN tripanossomal pela PCR	19
5.2.4.1	PCR com <i>primers</i> para amplificação da região ITS1	20
5.2.4.2	PCR com <i>primers</i> específicos para a detecção de <i>T. congolense</i> e de <i>T. vivax</i> , pela amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene da Proteinase Cisteínica homóloga à Catapsina L dos mamíferos.	20
5.2.5	Electroforese dos produtos das PCR's.....	21
5.2.6	PCR's para testagem de amostras de campo.....	22
6.	Resultados.....	23
6.1	PCR para amplificação da região ITS1.....	23
6.2	PCR para detecção de <i>T. congolense</i> e de <i>T. vivax</i> pela amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene da Proteinase Cisteínica homóloga à Catapsina L, dos mamíferos.	25
7.	Discussão.....	28
7.1	PCR de amplificação da região ITS 1 de <i>T. congolense</i> e <i>T. vivax</i>	28
7.2	PCR de amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene da Proteinase Cisteínica homóloga à Catapsina L dos mamíferos, para detecção de <i>T.</i> <i>congolense</i> e de <i>T. vivax</i>	31
7.3	Aplicação da PCR no diagnóstico de infecções naturais.....	32
8.	Conclusões e recomendações.....	33
8.1	Conclusões.....	33
8.2	Recomendações.....	34
9.	Bibliografia.....	35
10.	Anexos.....	39

1. INTRODUÇÃO

Tripanossomose é uma doença caracterizada por um amplo espectro de síndromas clínicos, causada pela presença e actividade de um ou mais parasitas patogénicos do género *Trypanosoma* no organismo de um vertebrado (Boyt, 1991, Urquhart *et al.*, 1996, Uilenberg, 1998 e OIE, 2004). Em África, os vectores mais importantes da doença, são as endémicas moscas do género *Glossina*, vulgarmente conhecidas por moscas tse-tsé. Estas moscas encontram-se distribuídas ao longo do vasto território do cinturão tse-tsé - África subsaariana entre as latitudes 14° N e 29° S (Urquhart *et al.*, 1996, Uilenberg, 1998 e OIE, 2004). Moçambique, faz parte desta área, e tem cerca de 75% do seu território habitado por *Glossina* spp (Jamal, 2005).

A tripanossomose ameaça inúmeros vertebrados desde os domésticos aos selvagens, sendo que, alguns tripanossomas afectam directamente o Homem (ex: *Trypanosoma gambiense* e *T. rodensiense*, causadores da doença do sono) (Boyt, 1991, Urquhart *et al.*, 1996, Uilenberg, 1998). Para África em geral e Moçambique em particular, a tripanossomose é particularmente marcante em termos económicos quando afecta o gado bovino, pois, causa grave morbidez e mortalidade aos animais infectados (Boyt, 1991, Urquhart *et al.*, 1996, Uilenberg, 1998 e OIE, 2004). Em África, o gado bovino tem importância não só como fonte de alimentos, energia de trabalho e dinheiro, mas também, como parte cultural das comunidades estimando-se que actualmente as perdas anuais devidas à tripanossomoses atinjam em média cerca de 5 milhões de dólares americanos/ano/país, no universo dos 37 países afectados pela doença (Uilenberg, 1998 e Jamal, 2005). Dentre as onze espécies patogénicas africanas, *Trypanosoma congolense* e *T. vivax* pertencentes a subgéneros diferentes (Anexo A), são os mais patogénicos agentes de tripanossomose bovina em Moçambique (Jamal, 2005), e são transmitidas ciclicamente pelas moscas tse-tsé.

Um vasto leque de técnicas directas e indirectas vem sendo aplicado no diagnóstico da tripanossomose. As técnicas directas baseiam-se na detecção do agente infeccioso, ou de suas partículas, ou ainda de elementos destas em amostras de tecidos de animais suspeitos. As técnicas indirectas baseiam-se na demonstração da presença de anticorpos induzidos pelo agente infeccioso. A técnica de PCR é a mais recente inovação no diagnóstico de

tripanossomose e enquadra-se nas técnicas directas (Kaufmann, 1996, 1999, Geysen *et al.*, 2003 e OIE, 2004).

Existe uma notável variabilidade entre os testes de diagnóstico clínico de tripanossomose no que respeita à sensibilidade, especificidade, facilidade e custos de aplicação (Uilenberg, 1998, OIE, 2004 e Conraths e Schares, 2006). A escolha de um teste particular acenta nos princípios económicos, na disponibilidade de especialistas, e principalmente no propósito do próprio diagnóstico. Assim, um diagnóstico diferencial deve combinar o teste apropriado e a correcta interpretação do resultado (Uilenberg, 1998 e OIE, 2004). Esta última depende muito da validade do teste e duma apropriada selecção, colheita e processamento da amostra (OIE, 2004 e Conraths e Schares, 2006). Segundo Gasser (2006), a técnica de PCR no diagnóstico clínico de tripanossomoses apresenta no geral excelente sensibilidade analítica e especificidade, tornando-se excelente escolha para ultrapassar os constrangimentos comuns aos outros diagnósticos que, apresentam níveis inferiores destes parâmetros em particular.

Correntemente em Moçambique, são aplicados testes parasitológicos nas prospecções anuais de tripanossomose pelo MINAG (DINAP, 1994, 1995, 1997), incorrendo-se no elevado risco de ocorrência de falsos negativos, e conseqüentemente, interpretação errónea da realidade no campo quanto à prevalência, dados epidemiológicos e eficácia do controlo da doença. A aplicação da PCR no diagnóstico clínico de tripanossomose no país seria uma mais valia, particularmente para estudos epidemiológicos onde segundo Desquesnes e Dávila, (2002) e Gasser (2006), se aconselha o uso de técnicas de diagnóstico com a maior sensibilidade possível, e para estudos de tipificação onde é requerido um grau elevado de especificidade.

Moçambique dispõe actualmente de condições básicas em termos de infraestruturas, equipamentos, especialistas e fontes de aquisição de reagentes para um avanço seguro na implementação da PCR no diagnóstico de tripanossomose, o que torna a avaliação da aplicabilidade da técnica imperiosa para abertura de novos horizontes na investigação de aspectos relacionados à doença e que exijam um diagnóstico apurado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Diagnóstico da tripanossomose

O diagnóstico é um procedimento chave no controlo de qualquer doença ou agente patogénico, tanto no campo como em infecções experimentais durante pesquisas científicas. No campo o diagnóstico permite avaliar a prevalência, e decidir qual a melhor forma de controlo, tanto de infecções isoladas como de epidemias (DINAP, 1995, Greiner, 1997, Murray, 1999). Segundo Murray (1999), no cinturão tse-tsé (Anexo B1), programas de criação de gado, altamente sustentáveis e prósperos, foram desenvolvidos na base de apurados diagnósticos da saúde dos animais em relação às tripanossomoses, o que permitiu um uso estratégico das drogas disponíveis para o controlo profilático da doença, tornando mais rentabilizáveis e efectivos os custos do processo global.

No campo, o diagnóstico inicial da tripanossomose baseia-se na presunção e, consiste em encontrar um animal com sintomas da doença, estando ou tendo passado por uma zona endémica (Kaufmann, 1996). Em geral, a sintomatologia clínica da tripanossomose inclui: febres intermitentes, edemas, aborto, emaciação (Urquhart *et al.*, 1996, OIE, 2004) e perda intermitente de apetite (Urquhart *et al.*, 1996). Estes sintomas devem-se à dilatação linfóide e esplenomegalia, à anemia hemolítica e à hipergamaglobulinémia (Urquhart *et al.*, 1996, OIE, 2004); frequentemente, o animal sofre miocardite aguda causada pela degradação celular no miocárdio (Urquhart *et al.*, 1996).

A confirmação da infecção é feita no laboratório recorrendo-se a variadas técnicas de testagem directa ou indirecta. As técnicas directas baseiam-se na demonstração directa da presença do parasita no animal infectado através de: (i) identificação pela análise parasitológica/microscópica; (ii) cultura *in-vivo*; (iii) análise imunológica; (iv) análise molecular baseada no ADN (Kaufmann, 1996, FAO, 1999, Geysen *et al.*, 2003, OIE, 2004). Por sua vez as técnicas indirectas baseiam-se em testes imunoserológicos, que detectam anticorpos induzidos pela infecção nos fluidos do hospedeiro (Uilenberg, 1998 e OIE, 2004).

A variabilidade entre as técnicas de diagnóstico quanto à sensibilidade interfere fortemente na escolha da técnica apropriada ao propósito final do diagnóstico, uma vez que, é exigido um grau de sensibilidade e especificidade diferente para a confirmação de uma

infecção individual em comparação com um rebanho ou para o estabelecimento da presença / ausência ou prevalência da doença em determinada área (OIE, 2004).

2.1.1 Diagnóstico directo

2.1.1.1 Técnicas Parasitológicas

As técnicas parasitológicas são as mais comumente aplicadas no diagnóstico laboratorial da tripanossomose. Em Moçambique o MINAG tem feito prospecções periódicas da doença (Anexos B2, C1 e C2) enquadradas no projecto de controlo da mesma, com recurso a técnicas parasitológicas de diagnóstico (DINAP, 1994, 1995, 1997). A sensibilidade analítica ou limite de detecção das técnicas parasitológicas mostra-se muito limitada, o que causa muitas vezes ocorrência de subquantificação da prevalência da doença no país. Esta sensibilidade é especialmente baixa, quando o resultado é considerado a nível individual, crescendo ligeiramente quando considerado a nível de um rebanho (Paris *et al.*, 1982, Uilenberg, 1998 e OIE, 2004).

Segundo Uilenberg (1998) e OIE (2004) nas técnicas parasitológicas, para identificação específica de tripanossomas devem ser sistematicamente examinados alguns itens da sua morfologia (Anexo D1 e D2), nomeadamente:

- ✓ presença ou ausência de tripanossomas de aparência diferente na população;
- ✓ presença ou ausência de um flagelo livre;
- ✓ tamanho do tripanossoma expresso em μm ;
- ✓ tamanho e posição do quinetoplasto;
- ✓ grau de desenvolvimento da membrana ondulatória.
- ✓ forma, particularmente da parte posterior do parasita;

São segundo Boyt (1991), Uilenberg (1998) e OIE, (2004), técnicas parasitológicas:

- as técnicas de identificação/exame directa – exame de gota fresca, exame de gota espessa e esfregaços finos corados;
- as técnicas concentração de parasitas – centrifugação em microhematócrito ou *Buffy coat* ou método de Woo, contraste de fase ou método de Murray e o método da centrifugação e troca de aniões;

- a técnica de cultura *in-vitro* – inoculação de animais de laboratório.

Tanto a sensibilidade como a especificidade destas técnicas, é totalmente dependente do volume de sangue da amostra examinado e da habilidade e experiência do microscopista que o examina. A caracteristicamente baixa quantidade de sangue examinado pelas técnicas de identificação directa leva a que o parasita apresente-se frequentemente escasso na amostra (OIE, 2004). Por outro lado, a necessidade de examinar o sangue ainda fresco - 2 a 6 h após a colheita - devido aos parâmetros usados para identificação, pode limitar a capacidade de cobertura de uma prospecção usando estes testes (Uilenberg, 1998 e Desquesnes, 1997).

As técnicas de concentração do parasita apresentam sensibilidade maior relativamente às técnicas de identificação directa, não obstante, a especificidade ser similarmente baixa (OIE, 2004). Paris *et al.* (1982), numa avaliação comparativa das técnicas parasitológicas, concluiu que a técnica de contraste de fase seria mais sensível na detecção de *T. congolense* e de *T. vivax* que a centrifugação em microhematócrito, facto que para o *T. vivax* contrasta com os dados de Desquesnes (1997). Este último considera a centrifugação em microhematócrito mais, ou igualmente, sensível que o contraste de fases.

Segundo OIE (2004), a técnica da centrifugação de microhematócrito é a mais amplamente usada no diagnóstico parasitológico de tripanossomose animal a nível mundial, e no caso de infecções por *T. vivax*, a sensibilidade da técnica aproxima-se dos 100% quando a parasitémia está acima de 700 tripanossomas/ ml de sangue, reduzindo a 50% quando esta se situa entre 60 a 300 tripanossomas/ ml, sendo muito difícil detectar os parasitas por esta técnica quando a parasitémia está abaixo dos 60 tripanossomas/ ml. Contudo, para além de simples as técnicas parasitológicas são relativamente menos dispendiosas em termos financeiros, o que as torna geralmente mais acessíveis.

2.1.1.2 Cultura *in vivo*

No período pré-patente (desde injeção dos tripanossomas no hospedeiro até ao aparecimento das primeiras formas do parasita no sangue) em alguns animais, o parasita não é detectável pelas técnicas parasitológicas; nestes casos pode-se inocular animais de laboratório com o sangue a ser examinado (Boyt, 1991, Uilenberg, 1998 e OIE, 2004). A sensibilidade da

técnica de cultura *in-vivo*, varia de acordo com as espécies ou até mesmo variedades de tripanossoma presentes no sangue a ser examinado, e com a susceptibilidade dos animais experimentais usados. Note-se que dentro da mesma espécie de tripanossoma pode haver muitas variedades e por conseguinte diferenças na susceptibilidade dos animais experimentais relativamente a cada variedade particular (Uilenberg, 1998 e OIE, 2004).

A técnica pode ser de grande valor como ferramenta de pesquisa sempre que animais experimentais (especialmente pequenos roedores) sejam susceptíveis à espécie, tipo ou variedade de tripanossoma a estudar (Uilenberg, 1998). Todavia, o custo da logística de transporte para campo torna o método não satisfatório para diagnóstico rotineiro ou a larga escala (estudos epidemiológicos) pois, os animais experimentais têm que ser mantidos e monitorados por longos períodos, não permitindo um diagnóstico imediato (Uilenberg, 1998). Por outro, lado esta técnica requiere ser complementada por uma das outras técnicas.

2.1.1.3 Detecção de antígenos tripanossómicos

A baixa sensibilidade analítica característica do diagnóstico parasitológico, impulsionou o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de tripanossomose mais sensíveis (Gréiner *et al.*, 1997). Os testes antígeno-delectores foram desenvolvidos para a detecção de antígenos circulantes de tripanossoma no sangue do hospedeiro (Greiner *et al.*, 1997 e Uilenberg, 1998). A variação antigénica – alteração da constituição da capa proteica do parasita e consequente reemissão de parasitémia – comum em infecções tripanossómicas, leva a que mesmo com a forte resposta imune (natural ou estimulada) do hospedeiro alguns antígenos do parasita estejam presentes e circulem no sangue do hospedeiro por longo tempo (Uilenberg, 1998). Deste modo, foram desenvolvidos testes baseados na acção dos anticorpos monoclonais contra antígenos internos invariáveis de tripanossomas (Uilenberg, 1998).

Este teste mostra frequentemente sensibilidade baixa e irregular, facto que se deve ao comportamento dos tripanossomas durante a infecção; estes só libertam os antígenos no sangue do hospedeiro quando mortos e desintegrados. Assim, na fase inicial da doença antes do primeiro pico de anticorpos causar a lise de muitos parasitas, os tripanosomas estão saudáveis e o teste resulta negativo (Uilenberg, 1998). Por outro lado, é provável que o resultado deste

teste seja negativo a cada pico de parasitas saudáveis cobertos por um novo tipo de antígeno (variação antigénica), só ficando positivo quando o sistema imune produz o anticorpo apropriado para cada variante particular de tripanosoma, pois, ocorre nesta fase a liberação dos antígenos tripanossomais (Uilenberg, 1998). A sensibilidade desta técnica para *T. vivax* mostrou-se particularmente baixa (4%) no ensaio realizado por Desquesmes (1997) a partir de um isolado incubado em cabritos, sendo-o consideravelmente abaixo da sensibilidade de técnicas de concentração de parasitas.

2.1.2 Diagnóstico indirecto / serológico

O diagnóstico serológico à semelhança dos testes antígeno-detectores foi desenvolvido no sentido de colmatar as limitações dos testes parasitológicos (Greiner *et al.*, 1997). Todavia no diagnóstico serológico aplicam-se técnicas indirectas, na medida em que, se baseiam na exploração da relação antígeno-anticorpo entre moléculas pré-definidas. As técnicas do diagnóstico serológico assentam fundamentalmente no facto da infecção com *Trypanosoma* induzir uma forte reacção do sistema imune do hospedeiro, resultando na produção de uma grande quantidade de anticorpos. O fenómeno da variação antigénica dos *Trypanosoma* resulta na produção de diferentes variedades de anticorpos pelo sistema imune do hospedeiro, disponibilizando-os deste modo para os testes de detecção e diagnóstico (OIE, 2004). Técnicas de detecção de anticorpos tripanossomais no soro do hospedeiro foram desenvolvidas, apresentando sensibilidade e especificidade variada - o teste de fluorescência indirecta de anticorpos (IFAT) e o Imuno Ensaio de Enzimas Ligadas (ELISA).

No geral, os testes serológicos apresentam elevada sensibilidade e especificidade, contudo, têm uma especificidade espécie-específica relativamente baixa (OIE, 2004). Por outro lado, estes testes não discriminam uma infecção corrente de uma infecção passada, tornando o diagnóstico da infecção activa presuntivo (OIE, 2004). Ainda assim, este não é o maior constrangimento desta técnica, pois é superado pelo facto dos anticorpos contra os *Trypanosoma* só serem detectáveis no soro do hospedeiro após 8 a 21 dias da infecção primária (Greiner *et al.*, 1997).

A amostragem de campo é relativamente fácil (pode ser feita em sangue fresco sem anticoagulante ou sangue seco em papel filtro), mas, os testes serológicos requerem equipamento sofisticado e pessoal qualificado para a sua execução. Contudo, em África o ELISA é muito usado na determinação a larga escala da distribuição de tripanossomas e da prevalência de tripanossomoses (Greiner *et al.*, 1997). Actualmente, a identificação dos principais antígenos e a sua produção como moléculas recombinantes ou peptídeos sintéticos, lidera o desenvolvimento e validação de novos testes baseados no uso de moléculas definidas (OIE, 2004).

2.1.3 Diagnóstico molecular baseado no ADN

Desde a introdução das técnicas de identificação directa baseadas na detecção do ADN do parasita, em 1980, o diagnóstico da tripanossomose vem melhorando de qualidade e fiabilidade (Desquesnes e Dávila, 2002), uma vez que com estas técnicas contornam-se muitas das limitações das outras técnicas de diagnóstico (Kaufmann, 1996, Uilenberg, 1998, Desquesnes e Dávila, 2002). Os testes moleculares assentam no princípio da demonstração da ocorrência no hospedeiro de sucessões de nucleótidos específicos para subgéneros, espécies, tipos ou até mesmo variedades de tripanossomas permitindo distinção intra ou inter níveis taxonómicos – os marcadores genéticos e/ou *locus* – (Kaufmann, 1996 e Uilenberg, 1998).

Segundo Uilenberg (1998), o ADN dos tripanossomas não persiste por muito tempo no hospedeiro após completa e efectiva eliminação de parasitas vivos. Deste modo, o resultado positivo dos testes moleculares indica a presença de uma infecção activa. Este facto permite que os testes moleculares, contrariamente aos sorológicos, sejam considerados bastante fiáveis e conclusivos não apenas na detecção do parasita no hospedeiro como também no vector (Uilenberg, 1998).

Os primeiros testes moleculares desenvolvidos para a detecção de parasitas foram os testes de hibridação de ácidos nucleicos (Kaufmann, 1996). Estes consistem na hibridação entre sondas (sequências de nucleótidos conhecidas sinteticamente produzidas) impregnadas em membranas de nitrocelulose e sequências de fita simples do ADN do parasita previamente desnaturado (Kaufmann, 1996, Uilenberg, 1998, OIE, 2004). Dependendo da sequência de

nucleótidos seleccionada para a sonda, o teste pode ser menos específico – sonda comum a espécies de um subgénero – ou mais específico – sondas específicas para cada espécie, subespécie ou até mesmo tipo – (Uilenberg, 1998). O método permite processamento simultâneo de muitas amostras (Kaufmann, 1996, Uilenberg, 1998, OIE, 2004), contudo, o processo é trabalhoso pois inclui uma fase preliminar de amplificação das sequências de ADN alvo pela PCR. Por outro lado, a não comercialização de sondas para tripanossomas obriga a que cada laboratório as produza, o que aumenta a complexidade da técnica (Uilenberg, 1998).

O desenvolvimento da técnica de PCR simples, para o diagnóstico de infecções parasíticas, trouxe novas possibilidades para a detecção de parasitas patogénicos no geral, pela sua elevada sensibilidade, especificidade (Kaufmann, 1996, Desquesnes, 1997, Geysen *et al.*, 2003, OEI, 2004) e pela facilidade de execução (Geysen *et al.*, 2003), apesar do seu custo tornar a técnica claramente proibitiva para aplicação rotineira (OIE, 2004), particularmente em países em vias de desenvolvimento.

2.2 A técnica de PCR na identificação de parasitas e diagnóstico de infecções

A reacção em cadeia da polimerase ou PCR, foi desenvolvida a partir de uma ideia de Kary B. Mullis, em 1978, aquando do seu trabalho como técnico na “Cetus Corporation”, em Emeryville – California/EUA, tendo sido inicialmente usada a ADNpolimerase termoinstável de *Echerichia coli*. A descoberta da *Taq*-polimerase – uma polimerase termotolerante e por conseguinte termoestável, isolada de um microrganismo também termotolerante, o *Thermus aquaticus* – veio cimentar o desenvolvimento da técnica da PCR que rapidamente difundiu-se na comunidade científica e foi sendo adaptada para os mais diversos fins de investigação (em http://paginas.terra.com.br/educacao/biolmol/aula7_PCR-RAPD-aplicar).

Na identificação de parasitas e diagnóstico de infecções, a PCR é aplicada com base em marcadores genéticos apropriados contendo uma magnitude adequada de variabilidade de sequências, de modo a permitir identificação dos parasitas ao nível taxonómico requerido. Várias regiões alvo na molécula de ADN têm sido usadas na identificação de parasitas pelo

PCR: DNA nuclear ribossomal (rDNA), DNA mitocondrial (mtDNA), elementos repetitivos e genes de cópias múltiplas (Desquesnes e Dávila, 2002 e Gasser, 2006).

Segundo Desquesnes e Dávila (2002), Njirru *et al.* (2005) e Gasser (2006) as regiões ITS1 e ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 1/2*) no rDNA dos parasitas apresentam marcadores genéticos para a diferenciação inter-específica, e são intra-especificamente muito conservadas. Estas regiões correspondem a sequências de múltiplas repetições tandem (Desquesnes e Dávila 2002). Os genes de cópias múltiplas no ADN de *T. vivax* e de *T. congolense* podem ser amplificados pela PCR, permitindo detecções ao nível específico. Correntemente, são ainda amplificados pela PCR sequências do genoma dos parasitas que permitem detecções subespecíficas, isto é, detecções intra-específicas (Desquesnes e Dávila 2002 e OIE, 2004). No entanto, para o *T. vivax* os *primers* ou iniciadores em uso, não permitem amplificar genes ou sequências para detecções subespecíficas (OIE, 2004), sendo por isso que, para esta espécie, não se identificam subespécies pela técnica da PCR, contrariamente ao *T. congolense*, para o qual já se conduzem PCR's para detecção de tipos (Desquesnes e Dávila 2002 e OIE, 2004).

Recentemente, o acoplamento da análise de RFLP no processo de identificação de múltiplas espécies de tripanossoma naquilo que constitui uma PCR pan-tripanosoma, veio permitir uma maior generalização do uso da PCR, em particular no campo académico, trazendo mais conhecimentos acerca da dinâmica da população parasita no hospedeiro ou até mesmo no vector, onde ocorrem normalmente infecções mistas (Desquesnes, 1997).

2.2.1 Princípio do método PCR

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é uma técnica que permite o aumento exponencial da quantidade, isto é, a amplificação, *in vitro* de um segmento alvo de ADN por meio da extensão simultânea das duas fitas complementares previamente flanqueados por *primers*, ou iniciadores, apropriados (Darbre, 1999, OIE, 2004). Os *primers* ou iniciadores, são oligonucleótidos sintéticos que devem ser complementares às sequências de nucleótidos nas extremidades do segmento de ADN alvo, para poderem flanqueá-lo. Um dos *primers* deve ser complementar à extremidade 3' da fita anti-senso – o *primer* adiante (*Forward*) – enquanto o

outro *primer* – o primer reverso (*Reverse*) – deve ser complementar à extremidade 3' da fita com senso (Darbre, 1999, OIE, 2004).

Uma polimerase – geralmente a *Taq* polimerase – catalisa a síntese das fitas complementares na direcção 5'→3' tendo como fitas originais/moldes, as fitas com e sem senso do fragmento de ADN, flanqueadas pelos *primers*. A amplificação do ADN alvo é conseguida pela acção conjunta da polimerase e do *primer Forward*, para a síntese directa da fita nova de ADN, fita que é então usada na reacção de síntese subsequente tendo desta vez como iniciador o *primer Reverse* e vice-versa. Deste modo a amplificação do fragmento alvo de ADN ocorre ao longo de ciclos sucessivos constituídos por: desnaturação da molécula de ADN, pareamento, ou *annealing* dos *primers*, e extensão pela *Taq* polimerase (Darbre, 1999) (Fig. 1).

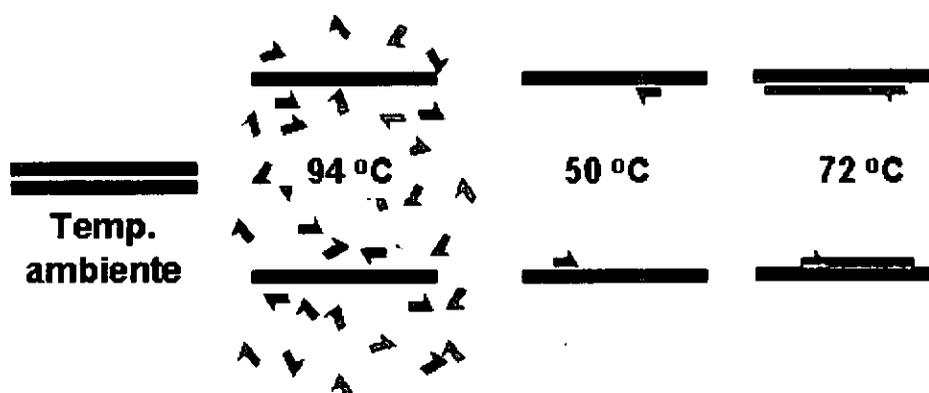


Fig. 1: Eventos nas três temperaturas básicas da PCR: desnaturação a 94 °C, pareamento ou *annealing* dos *primers* a 50 °C e extensão de novas fitas pela *Taq* polimerase a 72 °C.

(Fonte: http://paginas.terra.com.br/educacao/biolmol/aula7_PCR-RAPD-aplicar)

Cada etapa de um ciclo tem a sua temperatura de reacção, e esta influência fortemente no resultado final da reacção. A desnaturação da molécula de ADN original consiste na quebra das pontes de hidrogénio entre as bases complementares na dupla hélice de ADN e consequente separação das fitas complementares (Innis *et al.*, 1990 e Darbre, 1999). A desnaturação é um processo que ocorre a temperaturas elevadas, entre 94 e 97 °C, e deve durar um curto período de tempo para cada ciclo – cerca de 15 a 60 s – de modo a prevenir a inactivação irreversível da polimerase, sendo que, quanto mais elevada a temperatura menor

deve ser o tempo de duração da etapa (Innis *et al.*, 1990). Quando a temperatura de desnaturação é baixa, ou o tempo de duração da etapa é curto, a desnaturação pode ficar incompleta; por outro lado a longa duração da etapa aumenta o risco de inativação da *Taq* polimerase, que tem meia-vida de actividade de 2h, 40 min e 5 min para 92.5, 95 e 97.5 °C, respectivamente (Innis *et al.*, 1990).

O pareamento, ou *annealing*, consiste na ligação dos *primers* às suas respectivas regiões complementares nas fitas simples do ADN desnaturado (Darbre, 1999); a temperatura do pareamento é a mais baixa do ciclo – 55-72 °C segundo Innis *et al.* (1990) e 50-65 °C segundo Darbre (1999). Para Innis *et al.* (1990), temperaturas de pareamento elevadas, mas dentro do intervalo normal, aumentam a especificidade dos *primers*.

A extensão é a síntese das fitas complementares por incorporação de nucleótidos pela *Taq* polimerase (Innis *et al.*, 1990, Darbre, 1999). Tradicionalmente, a extensão ocorre a 72 °C pois, esta é a temperatura óptima de funcionamento da *Taq* polimerase. Estima-se que a esta temperatura a taxa de incorporação de nucleótidos varia entre 35 a 100 nucleótidos por segundo, dependendo de factores como: o tampão de PCR, o pH, a concentração de sais e a natureza do ADN (Innis *et al.*, 1990). Normalmente 1 minuto de extensão a 72 °C é tempo suficiente para se obter um *amplicon* de 2 Kb (2000 pb). No entanto, extensões prolongadas são favoráveis nos ciclos iniciais, quando a concentração de substrato é muito baixa, e nos ciclos finais quando a concentração do produto excede a concentração da enzima em aproximadamente 1nM (Innis *et al.*, 1990).

A reacção básica da PCR decorre em pequenos tubos de ensaio incubados em um termociclador. O termociclador é um equipamento programável controlado por um sistema digital, de modo a proceder automaticamente a ciclos de aquecimento e arrefecimento que permitam o cumprimento das etapas normais de um ciclo de reacção de PCR, em tantos ciclos quanto os necessários, e em conformidade com a programação digitada pelo operador (Darbre, 1999). Após vários ciclos, a região do ADN original que foi flanqueada pelos *primers* predominará no produto da reacção (Darbre, 1999), sendo o número óptimo de ciclos para obtenção de quantidade óptima de produto de PCR, ou *amplicons*, dependente da concentração inicial do ADN alvo, quando os outros parâmetros estão optimizados (Innis *et al.*, 1990). De facto, a cada ciclo a quantidade de *amplicons* cresce exponencialmente (Fig. 2), de modo que

seja possível visualizar com nitidez as suas bandas no gel após electroforese (Innis *et al.*, 1990, Darbre, 1999).

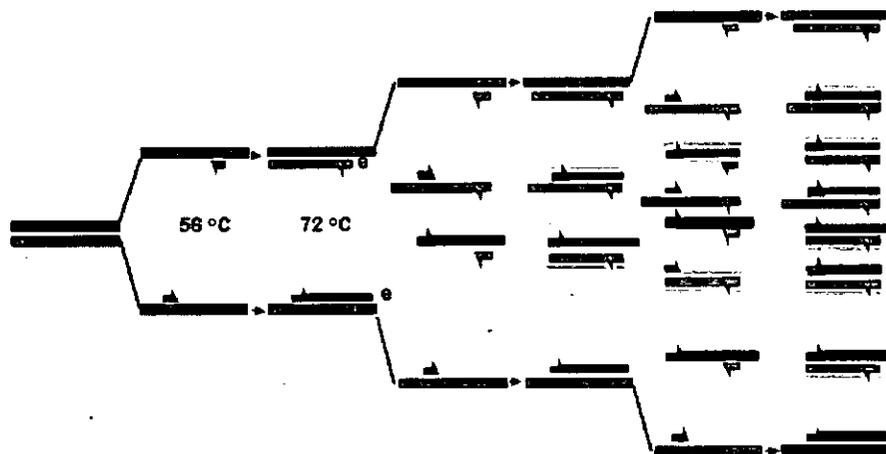


Fig. 2: Produção de novas fitas a partir de um ADN alvo pela PCR. As fitas novas são sintetizadas a 72 °C, dando origem a fragmentos estendidos (indicados no primeiro ciclo pela letra e) e fragmentos amplificados (contornados em amarelo), que se acumulam exponencialmente na reacção.

(Fonte: http://paginas.terra.com.br/educacao/biolo/mol/aula7_PCR-RAPD-aplicar)

2.2.2 Sensibilidade e especificidade da PCR no diagnóstico de tripanossomose

A detecção de ADN tripanossómico pela PCR tem incrementado consideravelmente a especificidade do diagnóstico da tripanossomose a nível espécie-específico, em particular quando comparada aos testes parasitológicos (Desquesnes e Dávila, 2003). A PCR aumenta a sensibilidade do diagnóstico que se apresenta geralmente duas a três vezes maior que a dos testes parasitológicos, em particular nos estágios mais avançados da infecção (Desquesnes, 1997). Segundo Desquesnes (1997), foi experimentalmente demonstrado, em animais severamente infectados por tripanossomas, que a sensibilidade do diagnóstico parasitológico ficava-se pelos 16% contra 40% de sensibilidade do diagnóstico pela reacção da PCR.

A elevada sensibilidade do diagnóstico pela PCR deve-se particularmente ao facto de milhões de cópias da sequência alvo de amplificação serem produzidas na reacção (OIE, 2004), aumentando assim o grau de resolução durante a revelação no gel. Por outro lado, a utilização de *primers* específicos para dada sequência de ADN alvo garante um elevado grau de especificidade do teste (OIE, 2004).

3. OBJECTIVOS

3.1 Objectivos gerais

1. Aplicar a técnica de diagnóstico da tripanossomose bovina, baseada na reacção da PCR para a detecção das espécies *T. congolense* e *T. vivax*, usando *primers* de detecção a nível universal e específico.
2. Avaliar a eficácia da PCR em função do método de extracção das amostras de ADN – extracção de sangue total e fervura (*Boiling*) de discos de papel de filtro impregnados com sangue contaminado.

3.2 Objectivos específicos

1. A partir do ADN extraído do sangue total e pelo método de fervura de discos impregnados não diluído, diluído 10x e 100x, diagnosticar pela PCR a tripanossomose bovina causada por *T. congolense* e *T. vivax*, em infecções experimentais, por meio da:
 - i. amplificação da região ITS1 do rADN dos tripanossomas com *primers* para detecção universal das espécies patogénicas africanas;
 - ii. amplificação com *primers* para detecção específica da região que codifica o domínio catalítico da proteinase cisteínica homóloga à Catepsina L (Cat L) dos mamíferos em *T. congolense* e *T. vivax*.
2. Diagnosticar pela PCR, a tripanossomose bovina causada por *T. congolense* e *T. vivax*, em infecções naturais, aplicando os três conjuntos de *primers* em estudo.

4. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Eduardo Mondlane, situado na Faculdade de Veterinária, Av. de Moçambique Km 1.5.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Amostras

5.1.1.1 Isolados de *Trypanosoma congolense* e de *T. vivax*

Para o ensaio foram usados sete (7) isolados de *T. congolense*, sendo cinco (1, 2, 3, 4 e 5) provenientes da província de Maputo, distrito de Matutuíne, e dois (6 e 7) da província de Sofala, distritos de Chupanga e Marromeu. Foi ainda usado um isolado de *T. vivax* (8) proveniente da província de Sofala. Todos os isolados de *T. congolense* estavam incubados em murganhos e o isolado de *T. vivax* impregnado em discos de papel de filtro.

5.1.1.2 DNA de amostras de campo

Para os testes de campo foram usadas 21 amostras de ADN extraído do sangue total de bovinos, previamente testado para a tripanossomose pelo método de centrifugação de microhematócrito (*Bufft coat*) e confirmado como positivo ou negativo, estando os positivos infectados com *T. congolense* ou *T. vivax* ou ambos. As amostras foram disponibilizadas pelo CB-UEM, datando a colheita do sangue, de 08/2005 em Matutuíne, Província de Maputo.

5.1.2 Equipamentos e materiais de laboratório

- Centrifuga de Microhematócrito QUIMIS®
- Caneta de ponta de diamante
- Tubos capilares de 75mm/75µl
- Banho-maria
- Microcentrifuga Eppendorf™ 5415D
- Fluxo laminar
- Termociclador iCycler BIORAD®
- Balança de precisão
- Equipamento de electroforese
- Trans-iluminador UV
- Máquina fotográfica digital
- Luvas
- Tubos de eppendorf
- Micropipetas de variados volumes

- Material laboratorial de vidro
- Material de laboratório metálico
- Seringas de 1 ml e agulhas 21G
- Lamparina
- Discos de papel de filtro (diâmetro 5mm; 1mm espessura)

5.1.3 Reagentes

Tampões

- PBS
- Tampão de lise
- Tris-HCl, 10 mM, pH 8 (*Buffer Taq*)
- TBE 1x
- Azul de bromofenol
- Brometo de etídio (10mg/ml)

Álcoois

- Etanol a 70%
- Etanol puro

Água

- destilada
- bidestilada ou MilliQ

Nucleótidos (sintéticos)

- *Primers* ou oligonucleótidos (Tabela 1)
- dNTPs
- Marcadores de peso molecular 100, 50 pb

Enzimas

- Proteinase K (20mg/ml)
- *Taq* polimerase

Soluções salinas

- Citrato de sódio
- MgCl₂

Outros

- Agarose Invitrogen™
- Plasticina

Tabela 1: *Primers* ou oligonucleótidos

Nome	Sequência	Produto (pb)	Especificidade	Referência
ITS 1cf	5'-CCGGAAGTTCACCGATATTG-3'	650/700	<i>T. congolense</i>	Njiru <i>et al.</i> , 2005
ITS 1br	5'-TTGCTGCGTTCCTCAACGAA-3'	250	<i>T. vivax</i>	
Tcongo4F	Desconhecida	188	<i>T. congolense</i>	Desconhecida
Tcongo3R	Desconhecida			
Tvi2	Desconhecida	177	<i>T. vivax</i>	Desconhecida
DT0156	Desconhecida			

5.2 Procedimentos

5.2.1 Diagnóstico pelo método de Woo

A certificação da infecção experimental dos murganhos, fontes de todas amostras de sangue usadas para obtenção do ADN dos isolados de tripanossomas para os testes experimentais, foi feita pelo método parasitológico de centrifugação em microhematócrito de acordo com OIE (2004) (Anexo E1). Para cada murganho foram analisados 25 µl do sangue periférico. Os resultados do teste foram considerados a partir da observação de uma única preparação microscópica. A quantificação estimada da parasitemia, dos murganhos positivamente infectados, foi estimada de acordo com o proposto por Paris *et al.* (1982), para esta técnica de diagnóstico (Tabela 2).

Tabela 2: Sistema de quantificação de parasitemia segundo Paris *et al.* (1982).

Tripanossomas por campo (ampliação 250x)	Nº de cruces	Parasitemia estimada (tripanossomas/ ml)
>100	6+	$> 5.10^6$
>10	5+	$> 5.10^5$
1 - 10	4+	$5.10^4 - 5.10^5$
1 por 2 campos - 10 por 10 campos	3+	$5.10^3 - 5.10^4$
1 - 10 por preparação	2+	$10^3 - 10^4$
1 por preparação	1+	$10^2 - 10^3$

5.2.2 Amostragem do sangue experimentalmente infectado

Foram usadas duas formas de amostragem de sangue infectado de murganhos para cada um dos 7 isolados de *Trypanosoma congolense*, a saber:

- amostragem a fresco (Anexo E2)- para extracção de ADN a partir de sangue total;
- amostragem a seco em discos de papel de filtro (Anexo E3) - para extracção do ADN pelo método de fervura (*Boiling*).

Todas as amostragens foram feitas a partir de murganhos cuja parasitemia fosse estimada em mais de 10^5 tripanossomas/ml usando-se o mesmo murganho para ambas as amostragens. O volume da amostra foi de 50 μ l para o sangue total (Tabela 3) e volume igual ou menor para a impregnação dos discos. Aos 7 isolados de *T. congolense* (isolados 1,2,3,4,5,6 e 7) na amostragem em discos foi adicionado 1 isolado de *T. vivax* (isolado 8).

Tabela 3: Tabela de amostragem de sangue total .

Isolado	Proveniência	Parasitemia (tripanossomas/ ml)	Volume da amostra	Parasitemia na amostra (tripanossomas/ μ l)
1	Sul	$> 5.10^6$	50 μ l	~ 5000
2	Sul	$> 5.10^6$	50 μ l	~ 5000
3	Sul	$> 5.10^6$	50 μ l	~ 5000
4	Sul	$> 5.10^6$	50 μ l	~ 5000
5	Sul	$> 5.10^6$	50 μ l	~ 5000
6	Centro	$> 5.10^6$	50 μ l	~ 5000
7	Centro	$> 5.10^6$	50 μ l	~ 5000

5.2.3 Extração do ADN

5.2.3.1 Extração do ADN do sangue total

A extração de ADN a partir do sangue total seguiu o protocolo descrito por Gonzales *et al.* (2006) citando Clausen *et al.* (1998), com pequenas variações (Anexo E4): foi usado PBS como tampão de extração em vez de tampão de lise (0.31 M sacarose, 0.001 M Tris-Cl, pH 7.05, 5 mM $MgCl_2$, 1% Triton X-100), e tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 0.5% Tween 20) para ressuspender o *pellet* final em lugar de tampão de PCR 1x (10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 1% Triton X-100), propostos no protocolo original. Para degradar as proteínas nucleares normalmente associadas ao ADN, usou-se a proteinase-k (20 mg/ml) que foi posteriormente inativada a altas temperaturas. A partir do produto final da extração foram preparadas para cada isolado mais duas alíquotas de ADN diluído 10x e 100x, respectivamente e todas alíquotas foram conservadas a -20 °C até serem usadas (a ordem das parasitemia estimada para cada nível de diluição está em Anexo E6). As alterações foram feitas apenas por questões de disponibilidade de reagentes.

5.2.3.2 Extração de ADN a partir de papel de filtro impregnado

A extração de ADN de discos de papel de filtro impregnados foi feita segundo o protocolo de extração de ADN com água descrito por Gonzales *et al.* (2006) citando Boid *et al.* (1999) (Anexo E5). Para cada isolado foram usados 1 disco. A partir do produto da extração foram feitas mais duas alíquotas correspondentes às diluições 10x e 100x (com água bidestilada), respectivamente, sendo então conservadas a - 20 °C até serem usadas (a ordem da parasitemia estimada para cada nível de diluição está em Anexo E6).

5.2.4 Amplificação do ADN tripanossomal pela PCR

Foram testados três conjuntos de *primers* para detecção de *Trypanosoma* spp. a partir do ADN obtido das duas formas de extração acima mencionadas, e nas respectivas diluições, usando:

- *Primers* ITS 1cf/br - para detecção de todos os tripanossomas patogénicos africanos, num diagnóstico universal;
- *Primers* Tcongo 4f/3r - para detecção específica de *T. congolense*, num diagnóstico diferencial/espécie-específico;
- *Primers* Tvi2f e DTO 156r para detecção específica de *T. vivax*, num diagnóstico diferencial/espécie-específico.

Para o isolado *T. vivax* só foram executados as PCR's a partir de ADN extraído de discos impregnados. Após avaliação da aplicabilidade em infecções experimentais estes PCR's foram submetidos a testagem de amostras de campo ou seja diagnóstico de infecções naturais..

5.2.4.1 PCR com *primers* para amplificação da região ITS1

- Primers : ITS1 cf (*Forward*); ITS1 br (*Reverse*)

- Mistura para a PCR

Cada reacção continha 23 µl da mistura de reacção e 2 µl de ADN num total de 25 µl. Os reagentes estavam nas seguintes concentrações finais: 1x tampão de PCR, 200µM dNTPs, 2mM MgCl₂, 1µM de cada *primer*, 0.5U/µl *Taq*-polimerase. As reacções decorreram nas condições descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Condições da PCR para amplificação da região ITS1

Etapa	Objectivo	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
1	Desnaturação inicial	94 °C	5 min	1
2	Desnaturação	94 °C	40 s	
3	Pareamento ou <i>annealing</i>	65 °C	40 s	35
4	Extensão	72 °C	90 s	
5	Extensão final	72 °C	10 min	1

5.2.4.2 PCR com *primers* específicos para a detecção de *T. congolense* e de *T. vivax*, pela amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene da Proteinase Cisteínica homóloga à Catepsina L dos mamíferos.

- Primers :

- Tcongo 4 (*Forward*) e Tcongo 3 (*Reverse*), para detecção de *T. congolense*

- Tvi2 (*Forward*) e DTO 156 (*Reverse*), para detecção de *T. vivax*

- Mistura para a PCR

As misturas para PCR tanto para a detecção de *T. congolense* como de *T. vivax* obedeceram à mesma concentração final de reagentes: 1x tampão, 200µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 50 ng de cada *primer* e 1U/µl de *Taq*-polimerase. Para a reacção foram usados 23 µl de mistura e 2 µl de ADN da amostra perfazendo um total de 25 µl cada. As reacções decorreram nas condições descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições da PCR de amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene homólogo ao da Catepsina L dos mamíferos

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos	Objectivo
1	94 °C	3 min	1	Desnaturação inicial
2	94 °C	1 min		Desnaturação
3	65 °C	1 min	30	Pareamento
4	72 °C	1 min		Extensão
5	72 °C	10 min	1	Extensão final

5.2.5 Electroforese dos produtos das PCR's

Todos os produtos das PCR's, incluindo os controlos negativo e positivo e os marcadores de peso molecular (100 pb e 50 pb), foram revelados por electroforese com gel de agarose a 1 % em tampão TBE 1x (0.1M tris-base, 0.1M ácido bórico, 0.005M EDTA, pH 8.3) na presença de brometo de etídio 0.5 µg/ml. Para a corrida, 10µl do produto da PCR foram misturados a 2 µl de azul de bromo fenol 6x como tampão de "carregamento" e o TBE 1x foi também usado como tampão de "corrida". A corrida electroforética decorreu a 120 volts por 1h e 30min para os *amplicons* da PCR ITS 1 e 45 min para os *amplicons* da PCR Cat L.

O gel foi examinado no trans-iluminador UV para visualização das bandas e fotografado para o registo das imagens. As amostras foram examinadas tanto directamente no trans-iluminador UV como nas fotografias, para avaliação do tamanho do produto e da nitidez da banda. O resultado foi considerado positivo quando para cada isolado as bandas visíveis no gel, após a electroforese, apresentassem o peso molecular esperado ou próximo do esperado, admitindo-se variações de até 15 pb (Tabela 1).

5.2.6 PCR's para testagem de amostras de campo

As 21 amostras de ADN, extraído do sangue de bovinos, disponibilizadas pelo CB-UEM foram testadas para a detecção de *Trypanosoma* spp, com os *primers* ITS 1cf/br, e para detecção de *T. congolense* e *T. vivax*, com *primers* Tcongo 4/ 3 e Tvi2 / DTO 156, respectivamente, e consequente diagnóstico de infecções naturais. Para estas PCR's as misturas e a electroforese dos produtos da PCR obedeceram às condições acima descritas para cada conjunto de *primers*.

6. RESULTADOS

6.1 PCR para amplificação da região ITS1

Exceptuando o isolado 2 de *T. congolense*, todos outros isolados experimentais foram positivos em pelo menos uma das condições do ADN amostral no PCR com os primers ITS1 cf/br (Tabela 6) havendo diferenças quanto à nitidez e definição das bandas dos produtos de PCR no gel, relacionadas ao método de extracção de ADN amostral. Todos controis, tanto positivos como negativos, apresentaram os resultados esperados, isto é, o controlo positivo foi positivo e o controlo negativo manteve-se negativo.

Tabela 6: Resultados do PCR de amplificação da ITS 1 para os dois métodos de extracção de ADN nas infecções experimentais.

Isolados	ADN extraído de sangue total			Tamanho em pb	ADN extraído por fervura de discos			Tamanho em pb
	ND**	10x	100x		ND**	10x	100x	
1	+	+	+	700	-	-	-	
2	-	-	-		-	-	-	
3	+	+	+	700	-	-	-	
4	+	+	+	650	-	-	-	
5	+	+	+	700	-	-	-	
6	+	+	+	700	-	-	-	
7	-	+	-	700	-	-	-	
8					+	+	-	250
P* (Tb)	+	+	+	500				

*Controlo Positivo (amostra de *Trypanosoma brucei*)

**Não diluído

Os isolados experimentais de *T. congolense* cujas amostras de ADN para o PCR foram extraídas de sangue total mostraram-se positivas tanto nas diluições como no produto bruto da extracção, excepção feita ao isolado 7, que foi positivo apenas para a diluição 10x do ADN da amostra, ainda que com uma banda muito ténue, e ao já mencionado isolado 2, que foi negativo para todas as condições de extracção e diluição (Fig. 3). As bandas mostraram-se diferenciadas, em termos de nitidez e de definição, em conformidade com nível de diluição do ADN da amostra, tendo apresentado, no geral bandas com fraca nitidez e muito mal definidas.

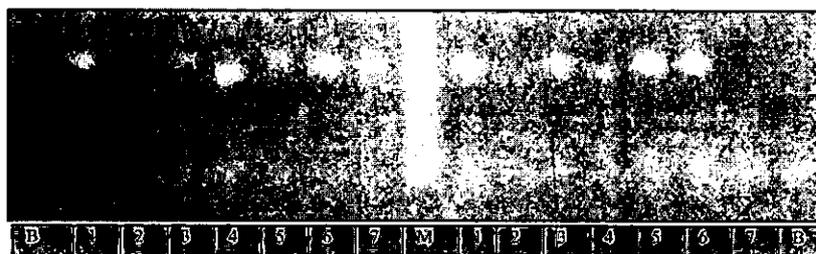


Fig. 3: Exemplo de gel electroforese de produtos da PCR do ADN extraído de sangue total, com *primers* ITS 1cf/br. Note-se a fraca intensidade ou nitidez das bandas. Todas são amostras *T. congolense* com produtos de 650 pb (isolado 4) e 700 pb (todos restantes isolados). Amostras de ADN diluídas 10x antes do marcador 100 pb (M) e 100x depois; B-controlo negativo.

Na PCR, com o ADN extraído pelo método de fervura (*boiling*) a partir de discos de papel de filtro, usando os *primers* ITS1 cf/br, todas amostras de *T. congolense* foram negativas, sendo positivo apenas o isolado 8 de *T. vivax*, na PCR com o produto bruto da extracção e com este diluído 10x (Fig. 4).

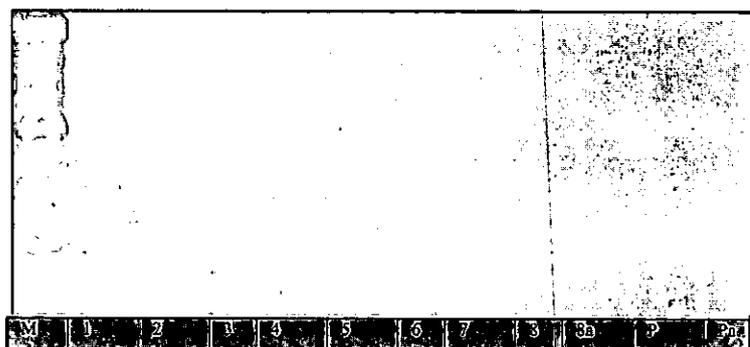


Fig. 4: Exemplo de gel electroforese de produtos da PCR do ADN extraído de discos impregnados pelo método de fervura (*Boiling*) com *primers* ITS 1cf/br. O isolado 8 de *T. vivax* é positivo (250 pb) na PCR com ADN diluído 10x com banda muito ténue (8 no gel). Todos isolados *T. congolense* (1 a 7 gel à esquerda) foram negativos. O controlo positivo foi positivo (ADN diluído 10x e 100x P e Pa no gel respectivamente). Note-se a forte nitidez da fronteira de electroforese ao nível da banda de 100 pb do Marcador.

Na PCR das amostras de campo (provenientes de Bovinos), utilizando os *primers* ITS1 cf/br, apenas 11 das 21 amostras foram positivas (Fig. 5), tendo todos positivos confirmado o resultado do diagnóstico parasitológico feito aquando da colheita das amostras de sangue nos bovinos, tanto quanto à infecção como quanto à espécie infectante (Anexo F). O controlo negativo apresentou o resultado esperado, isto é, foi negativo. Os produtos da PCR de amplificação da região ITS 1, nas amostras de campo, apresentam 650 pb (amostras 1, 8 e 12) ou 700 pb (amostras 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14 e 17).

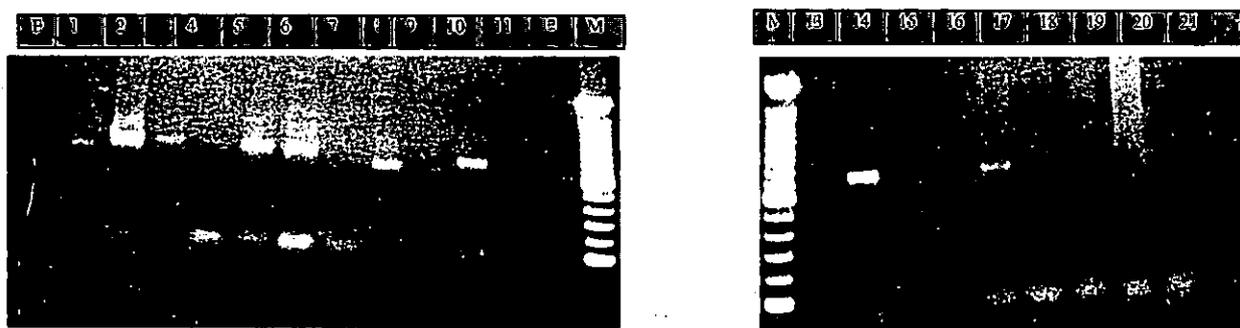


Fig. 5: Geis electroforese dos produtos da PCR do ADN extraído de amostras de campo, com *primers* ITS 1cf/br. 11 das 21 infecções são confirmadas e todas com *Trypanosoma congolense*. M – marcador 100.

Não foram detectadas outras espécies de tripanossomas para além das já esperadas (*T. congolense* e *T. vivax*) tanto nos PCRs do ADN das infecções experimentais como nos PCRs das infecções naturais.

6.2 PCR para detecção de *T. congolense* e de *T. vivax* pela amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene da Proteinase Cisteínica homóloga à Catepsina L, dos mamíferos.

Tal como para a amplificação da região ITS1, na amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene da proteinase cisteínica, homóloga à Catepsina L dos mamíferos (PCR Cat L), todos os isolados das infecções experimentais em murganhos foram positivos em pelo menos uma das condições de extracção do ADN, com produtos de 190 pb para *T. congolense* e 180 pb para *T. vivax* (Tabela 7), havendo também diferenças na nitidez

das bandas, tanto em relação ao método de extracção do ADN como aos níveis de diluição do mesmo. Todos os controlos apresentaram os resultados esperados e normais.

Tabela 7: Resultados do PCR Cat L para as infecções experimentais nos dois métodos de extracção de ADN.

Isolados	ADN extraído de sangue total			Tamanho em pb	ADN extraído por fervura de discos			Tamanho em pb
	ND**	10x	100x		ND**	10x	100x	
1	+	+	+	190	+	+	-	190
2	+	+	+	190	+	+	-	190
3	+	+	+	190	-	-	-	
4	+	-	-	190	-	-	-	
5	+	+	+	190	+	+	-	190
6	+	+	+	190	-	-	-	
7	+	+	+	190	-	-	-	
8					+	+	-	180

Na PCR Cat L com ADN extraído do sangue total, todos os isolados experimentais foram positivos tanto para o produto bruto da extracção como para as diluições 10x e 100x, exceptuando o isolado 4 de *T. congolense*, que só foi positivo na PCR com o produto bruto da extracção do ADN. No geral, as bandas do produto de PCR com o produto bruto da extracção do ADN e ADN diluído 10x, após a electroforese do gel, foram marcadamente nítidas e definidas (exceptuando os isolados 3 e 4 ADN diluído 10x), mas as bandas do produto de PCR com ADN diluído 100x mostraram uma menor nitidez (Fig. 6).

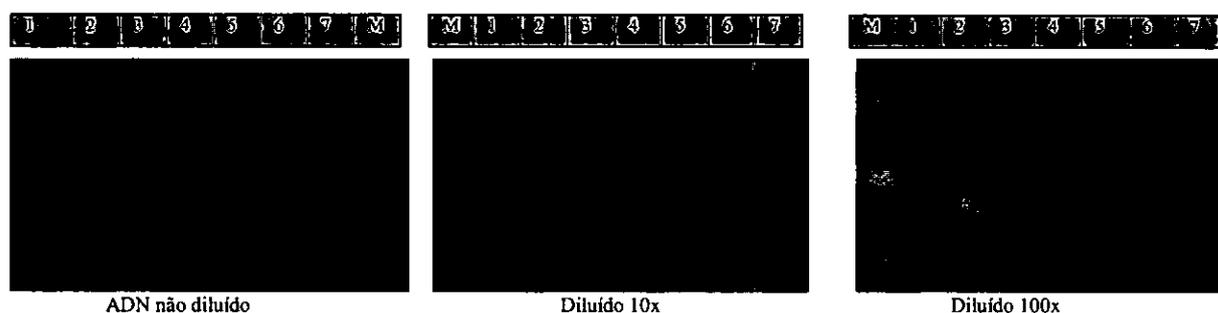


Fig. 6: Geis electroforese dos produtos da PCR Cat L partindo de ADN extraído de sangue total das infecções experimentais - ADN não diluído, diluído 10x e diluído 100x respectivamente. Note-se a maior intensidade ou nitidez das bandas, particularmente no produto bruto da extracção. Todas isolados detectados são de *T. congolense* com cerca de 190pb.

O PCR Cat L com ADN extraído de discos impregnados pelo método de fervura foi positivo para alguns dos isolados (Tabela 7), tendo sido observadas variações na resposta inclusive para o mesmo isolado quando o teste é considerado nos diferentes níveis de diluição do ADN molde/amostral. Os isolados 1, 2, 5 de *T. congolense* e o isolado 8 de *T. vivax* foram os únicos positivos neste teste (Fig. 7).

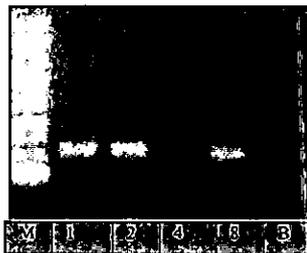


Fig. 7: Exemplo de gel electroforese dos produtos do PCR Cat L com ADN extraído de discos impregnados pelo método de fervura (*Boiling*). Neste gel apresetam-se positivos os isolados 1 e 2 de *T. congolense* e o isolado 8 de *T. vivax*. PCR com ADN produto bruto da extracção. M – marcador de peso molecular 100 pb.

Na testagem de amostras de campo 13 foram positivas (Fig. 8), das quais 4 tinham sido negativas no PCR de amplificação da região ITS 1. Das 8 amostras negativas no PCR Cat L, 3 tinham sido positivas na PCR de amplificação da região ITS 1 (Anexo F).



Fig. 8: Exemplo de gel electroforese de produtos da PCR Cat L amostras de campo (de 13 das 21). Apenas algumas das infecções positivas no *Buffy coat* são confirmadas infectadas com *Trypanosoma congolense* ou *T. vivax*. Neste gel estão confirmadas infecções com *T. congolense*.

7. DISCUSSÃO

7.1 PCR de amplificação da região ITS 1 de *T. congolense* e *T. vivax*

Recentemente, foi reportado como um grande avanço o desenvolvimento de uma técnica de diagnóstico molecular da tripanossomose baseado num único PCR, com largo potencial de aplicabilidade: a amplificação da região ITS 1 num diagnóstico multi-específico (Desquesnes e Dávila, 2002 e Njiru *et al.*, 2005). Segundo Desquesnes e Dávila (2002), as regiões ITS 1 e ITS 2 constituídas por genes de cópias múltiplas no rADN, fazem parte das unidades transcricionais em conjunto com as subunidades ribossomais 5S, 8S e 28S. A região ITS 1 dos Kinetoplastida apresenta uma variação interespecífica na ordem de 300 – 800 pb, oferecendo assim um forte potencial de aplicabilidade num diagnóstico pela PCR com *primers* apropriados (Desquesnes e Dávila, 2002 e Njiru *et al.*, 2005), tal é o caso dos *primers* ITS 1 *cf/br* (Njiru *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos no presente ensaio mostram que a performance da PCR de amplificação da região ITS 1 é fortemente afectada pelo método de extracção da amostra de ADN. A ocorrência de falsos negativos, particularmente no PCR com ADN de *T. congolense* extraído de discos de papel de filtro pelo método de fervura (*Boiling*), é indicativa de que este método de extracção pode não ser ideal para o diagnóstico de tripanossomose pela PCR de amplificação da ITS 1. Contrariamente, a extracção em sangue total mostrou resultados mais consistentes, ainda que, com muito baixa taxa de amplificação - bandas muitíssimo ténues.

No PCR ITS 1 com ADN extraído de sangue total, houve amplificação de todos isolados e em todas as diluições, exceptuando o isolado 2, cujo o produto bruto de extracção do ADN mostrou aparente hemoglobina remanescente podendo esta ter inibido o desenvolvimento das reacções. Esta constatação encontra suporte em Desquesnes e Dávila (2002), que referem que no geral, os falsos negativos de uma PCR podem dever-se à: (i) presença de factores inibidores da reacção de PCR na amostra de ADN (hemoglobina, EDTA, etc.); (ii) presença de DNAases que destroem as sequências alvos; (iii) quantidade de ADN presente na amostra (tanto a elevada como a baixa concentração).

O erro humano pode também induzir a falsos negativos na PCR, sendo muito difícil saber com exactidão qual dos factores acima mencionados é a causa de um particular falso

negativo. Contudo, uma vez que no presente ensaio, as mesmas amostras de ADN extraído de discos foram usadas tanto na PCR de amplificação do ITS 1 como na PCR Cat L, descarta-se a presença de inibidores nas amostras como causa dos falsos negativos para pelo menos 3 isolados positivos para a PCR Cat L – os isolados 1, 2 e 5. Boid *et al.* (1999), reporta que a segunda incubação na extração por fervura de discos elimina todos possíveis factores inibidores da PCR na amostra (incluindo restos de componentes celulares e de papel de filtro), no entanto, admite que perde-se muito do ADN na amostra ao descartar o primeiro sobrenadante, pois este vai com boa parte dos tripanossomas (mais de 50%).

As diluições do produto da extracção de ADN, 10x e 100x, permitem avaliar a sensibilidade analítica do teste, não obstante, o desconhecimento da concentração do ADN no produto bruto da extracção. Segundo Boid *et al.* (1999), equanto a extração de ADN de sangue total garante a recuperação de quase a totalidade do ADN tripanossómico na amostra, pela fervura de discos impregnados há perda de mais de 50% deste ADN quando se descarta o primeiro sobrenadante.

Considerando a estimativa de parasitémia correspondente aos níveis de diluição do ADN de acordo com o método de extracção (Anexo E6), e mediante os resultados obtidos fica por determinar o limite de detecção da PCR ITS 1. Isto porque, este PCR foi negativo com ADN de *T. congolense* extraído por fervura (*boiling*) de discos em todos níveis de diluição quando, teoricamente, o ADN não diluído e diluído 10x correspondem em princípio a níveis de parasitémia abaixo e acima da parasitémia do ADN extraído de sangue total não diluído e diluído 100x. Estes últimos PCRs foram positivos. Por outro lado, pode ter havido superestimação das parasitémias correspondentes ao ADN extraído por fervura, pois, não se sabe a quantidade exacta de tripanossomas perdidos no processamento.

Gonzales *et al.* (2006) e Desquesnes e Dávila (2002), reportaram os *primers* ITS, no geral, como *primers* de baixa sensibilidade, estando este facto relacionado às limitadas repetições dos genes de cópias múltiplas nas regiões ITS 1 – 100 a 200 repetições tandem – e à homologia das sequências entre as espécies. No ensaio de Gonzales *et al.*, (2006), a sensibilidade da PCR de amplificação do ITS 1 de *T. vivax*, com ADN extraído por fervura de discos impregnados, ficou-se pelos 30 % contra os 90% quando o ADN era extraído a partir 250µl de sangue total. A sensibilidade da PCR com os *primers* ITS 1 cf/br, nesse ensaio, foi mais baixa comparativamente aos *primers* de detecção específica.

Pode-se considerar que no presente ensaio se confirma a baixa sensibilidade dos primers ITS 1 – 40% (18/45) para a totalidade dos ensaios, sendo 76% (16/21) para a extracção a partir de sangue total e apenas 8% (2/24) para a extracção por fervura de discos impregnados – por um lado pelo elevado número de falsos negativos e, por outro, pela fraca nitidez das bandas no gel, indicando uma baixa taxa de amplificação. Esta baixa sensibilidade é particularmente marcante quando o ADN é extraído por fervura de discos, sendo completamente nula para isolados de *T. congolense*.

Segundo Desquesnes e Dávila (2002), apesar da PCR poder detectar tripanossomas a partir de uma única molécula de ADN alvo na amostra, é sempre recomendável a presença de uma quantidade ideal de moléculas de ADN alvo para garantir boa sensibilidade à técnica, particularmente quando a amostra de ADN está em suspensões. A fraca nitidez das bandas, especialmente notável nas PCR com o produto bruto da extracção e com o ADN diluído 100x, deve estar relacionada com uma concentração não ideal do ADN nestas reacções. Nalguns casos, quando a parasitemia na infecção é muito alta e o ADN na amostra é muito concentrado a PCR resulta numa fraca amplificação, ou até mesmo, em falsos negativos (Desquesnes, 1997), por outro lado a baixa parasitemia (1 – 20 parasitas/ml) pode levar a falsos negativos, não pela baixa sensibilidade da PCR mas sim, pela ausência do ADN alvo na amostra (Desquesnes e Dávila, 2002).

No geral, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a PCR de amplificação da região ITS 1 permite uma detecção diferencial de *T. congolense* e de *T. vivax* e o consequente diagnóstico da tripanossomose bovina, causada por estes agentes em particular, estando em concordância com os resultados obtidos por Njiru *et al.* (2005) na detecção de tripanossomas patogénicos africanos pela amplificação do ITS 1. Este autor reporta ainda que com a PCR de amplificação da ITS 1, é possível fazer tipificação de *T. congolense*, pois para esta espécie produtos de PCR ITS 1 com primers ITS 1 cf/br ao peso de 650, 700 e 720 pb correspondem respectivamente aos tipos *kilifi*, *savanaah* e *forest*. Testagens paralelas feitas às infecções experimentais no decorrer do presente trabalho através de PCRs de detecção de *T. congolense* tipo *kilifi* e tipo *savanaah*, confirmaram esta situação com o isolado 4 a confirmar-se tipo *kilifi* e os restantes tipo *savanaah*.

7.2 PCR de amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico do gene da Proteinase Cisteínica homóloga à Catepsina L dos mamíferos, para detecção de *T. congolense* e de *T. vivax*

Contrariamente à PCR de amplificação do ITS 1, a PCR de amplificação da sequência que codifica o domínio catalítico dos genes das proteinases cisteínicas homólogas à Catepsina L dos mamíferos, ou PCR CatL, permite um diagnóstico espécie-específico, pois, para esta PCR foram desenvolvidos *primers* para detecção específica do domínio catalítico das proteinases cisteínicas de *T. congolense*, e *primers* para detecção específica do domínio catalítico das proteinases cisteínicas de *T. vivax*. Os genes das proteinases cisteínicas são um excelente alvo de amplificação pela PCR para a detecção espécie-específica de tripanossomas e diagnóstico diferencial de infecções (Eakin *et al.*, 1990). Segundo Serveau *et al.* (2003), as proteinases cisteínicas são antígenos imunodominantes fortemente envolvidos na patogencidade da tripanossomose pois são o factor patogénico da relação parasita-hospedeiro: controlam modificando a resposta imune do hospedeiro e promovem a diferenciação dos parasitas quanto ao hospedeiro. Deste modo, os genes das proteinases cisteínicas para além de serem intraespecificamente conservados e interespecificamente variados, são fortemente expressos, tornando-se ideais para amplificação no diagnóstico molecular.

No presente trabalho, a PCR Cat L apresentou muito melhor performance em comparação com a PCR de amplificação do ITS, para ambos os métodos de extracção de ADN. No diagnóstico das infecções experimentais, a PCR Cat L mostrou 60% (27/45) de sensibilidade contra os 40 % da PCR ITS 1, sendo de 90% (19/21) para a extracção em sangue total e de apenas 33% (8/24) para a extracção por fervura de discos impregnados. Gonzales *et al.* (2006), reportam os *primers* de detecção espécie-específica como sendo no geral de maior sensibilidade relativamente aos *primers* universais, particularmente na detecção de *T. vivax*. Considerando a ordem das parasitémias correspondentes a cada nível de diluição do ADN nas duas formas de extracção (Anexo E6), assume-se que a sensibilidade analítica do teste PCR Cat L se atinge-se com o ADN da fervura de discos diluído 10x.

7.3 Aplicação da PCR no diagnóstico de infecções naturais

A aplicação da PCR na detecção de ADN tripanossómico e no diagnóstico de infecções naturais é já uma realidade presente, e com um futuro cada vez mais promissor, em várias comunidades africanas. Segundo Mugittu *et al.* (2001), o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade baseadas no ADN tem facilitado os estudos epidemiológicos das tripanossomoses em vários países africanos, entre eles: Uganda, Costa do Marfim, Burkina Faso e Tanzania. Solano *et al.* (1999), avaliando pela primeira vez a aplicabilidade do diagnóstico molecular de tripanossomoses, baseado na PCR, em infecções naturais no Este de África para acesso à prevalência da doença na região, constatou que a taxa de prevalência da doença é muito mais alta quando se aplica a PCR no diagnóstico do que quando se aplica o diagnóstico parasitológico ou serológico. Este facto deve-se à elevada sensibilidade da técnica na ausência de inibidores, ou outros factores negativos (Solano *et al.*, 1999 e Desquesnes e Dávila, 2002). Em Moçambique a técnica de PCR não é ainda aplicada a estudos epidemiológicos.

No presente trabalho, o diagnóstico universal de infecções naturais pela amplificação do ITS 1 obteve uma sensibilidade na ordem dos 52% (11/21) contra os 62% (13/ 21) do diagnóstico espécie-específico pela PCR Cat L, comprovando mais uma vez a maior eficácia dos *primers* espécie-específicos na detecção de tripanossomas. Os níveis de sensibilidade atingidos nas duas PCR's, tanto para as infecções experimentais como para as infecções naturais, quando o ADN é extraído do sangue total são bastante satisfatórios, contrariamente aos obtidos quando o ADN é extraído por fervura de discos, indicando uma menor eficácia da purificação do ADN pelo último método.

Para além de promover o incremento da qualidade, por elevação da sensibilidade e especificidade do diagnóstico das tripanossomoses bovinas em particular, a aplicação da PCR na detecção de tripanossomas pode prover um sistema de diagnóstico rápido, abrangente e eficaz. Estudos de prevalência e de distribuição podem ser desenvolvidos com base nesta técnica de diagnóstico obtendo resultados mais realistas (Solano *et al.*, 1999 e Desquesnes e Dávila, 2002). Todavia, o custo extremamente elevado (1 US \$/amostra Desquesmes (1997)) da aplicação desta técnica torna proibitiva sua aplicação rotineira

8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

8.1 Conclusões

As conclusões que se seguem são particularmente válidas para as PCR's efectuadas com os *primers* usados neste trabalho e sob as condições de PCR anteriormente descritas.

- Existe aplicabilidade para a PCR no diagnóstico molecular de tripanossomose bovina no país, em pelo menos uma instituição – o CB-UEM.
- Para este diagnóstico, quando a amostra em causa é o sangue, o ADN deve ser extraído do sangue total, para garantir eficácia ao teste.
- A extracção de ADN de discos de papel de filtro impregnados pelo método fervura não é aconselhável.
- O diagnóstico espécie-específico é no geral mais sensível que o diagnóstico universal. O seu limite de detecção situa-se à parasitémia de correspondentes à diluição 10x do ADN extraído por fervura de discos. Não foi possível determinar o limite de detecção da PCR ITS 1.
- Apesar da melhor eficácia do diagnóstico espécie-específico, a aplicação conjunta dos dois diagnósticos nas infecções naturais é aconselhada, pois, se o diagnóstico específico é mais eficaz, o diagnóstico universal pode detectar qualquer uma das espécies de tripanossomas patogénicos africanos, numa única PCR. No entanto tomando em consideração os custos da técnica, optar por um dos dois PCR pode permitir economia de finanças, sendo nestas circunstâncias o alcance que se pretende com o diagnóstico (universal ou específico), o factor que deve definir qual o melhor PCR a aplicar.

8.2 Recomendações

Tendo se constatado, ao longo do presente trabalho, que um dos maiores constrangimentos para a PCR é garantir qualidade e quantidade às amostras de ADN recomendo:

- Uma avaliação de outros métodos de processamento da amostra para extracção do ADN de modo a garantir pureza e concentração adequadas. Uma pré-concentração dos parasitas a anteceder a impregnação de discos de papel de filtro ou a anteceder a extracção em sangue total, pode garantir presença de quantidade satisfatória de ADN na amostra final. Por outro lado, uma avaliação de outros métodos de extracção do ADN de discos pode oferecer melhores resultados e viabilizar um método de amostragem bastante simples para trabalhos de campo.
- A pré-quantificação do ADN a anteceder a PCR deve ser equacionada. Isto pode permitir uma reavaliação da sensibilidade analítica do teste.
- Todas PCR's efectuadas no presente trabalhos não foram previamente validadas nas condições locais, de acordo com os pressupostos da OIE, deste modo, é imperiosa a sua validação para garantir não apenas a optimização das reacções mas também, propriedade dos resultados destes testes e, conseqüentemente, um alto patamar de comparação com resultados de outros laboratórios, cujas técnicas estejam igualmente validadas.
- Em Moçambique há poucos (para não dizer nenhum) registos de trabalhos na área de diagnóstico molecular baseado no ADN em geral, particularmente no diagnóstico de tripanossomoses. Recomenda-se a aposta nesta área de investigação científica em geral – a Biotecnologia – e particularmente na biotecnologia direccionada a doenças epidémicas pelo seu bem conhecido poder destrutivo. Esta aposta não deve cingir-se ao diagnóstico mas a outras áreas possíveis, como a terapêutica.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Boid, R, T. W. Jones e A. Munro (1999). A simple procedure for the extraction of trypanosome DNA and host protein from dried blood meal residues of hematophagous Diptera. Veterinary Parasitology. 85 313-317.
2. Boyt, W. P. (1991) Tripanossomoses animais em África: diagnóstico tratamento e prevenção. 1ª ed. CTA. Lisboa – Portugal.
3. Conraths, F. J. e G. Schares. (2006). Validation of molecular-diagnostic techniques in the parasitological laboratory. Veterinary Parasitology. 136. 91–98
4. Darbre, D. P. (1999). Basic Molecular Biology: essential techniques series. John Wiley & Sons Ltd. England. 194 pp.
5. Desquesnes, M. (1997). Evaluation of a simple PCR technique for the diagnosis of *Trypanosoma vivax* infection in the serum of cattle in comparison to parasitological techniques and antigen-enzyme-linked immune sorbet assay. Acta Tropica. 65: pp 139 - 148.
6. Desquesnes, M. e A. M. R. Dávila. (2002). Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. Veterinary Parasitology. 109. pp 213 – 231.
7. DINAP. (1993). Relatório Anual. Ministério da Agricultura. Maputo – Moçambique. 19 pp.
8. DINAP. (1994). Relatório Anual. Ministério da Agricultura. Maputo – Moçambique. 22 pp.

9. DINAP. (1995). Relatório Anual. Ministério da Agricultura e Pescas. Maputo – Moçambique. 43 pp.
10. DINAP. (1997). Relatório Anual. Ministério da Agricultura e Pescas. Maputo – Moçambique. 17 pp.
11. Eakin, Ann E., J. Bouvier, J. A. Sakanar, C. S. Craik e J. H. McKerrow. (1990) Amplification and sequencing of genomic DNA fragments encoding cysteine proteases from protozoan parasites. Molecular and Biochemical Parasitology, 39 1-8.
12. Gasser, R. B. (2006). Molecular tools – advances, opportunities and prospects. Veterinary Parasitology. 136. 69-89.
13. Geysen, D., V. Delespaux e S. Geerts. (2003). PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for specie-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle. Veterinary Parasitology. 110. pp 171 – 180.
14. Gonzales, J. L., A. Loza e E. Chacon. (2006). Sensitivity of different *Trypanosoma vivax* specific primers for the diagnosis of livestock trypanosomosis using different DNA extraction methods. Veterinary Parasitology. 136. pp 119-126.
15. Griener, M., S. Kunar e C. Kyeswa. (1997). Evaluation and comparison of antibody ELISAs for serodiagnosis of bovine trypanosomosis. Veterinary Parasitology. 73. pp 197 – 205.
16. Kaufmann, J. (1996). Parasitic Infection of Domestic Animals: a Diagnostic Manual. Birkhäuser Verlag. Basel – Germany. 423 pp
17. Innis, M^a, D. H. Gerfand, J. J. Sninsky e T. J. White. (1990). PCR protocols: Guide to methods and applications. Academic Press, Inc. USA. 482pp

18. Jamal, S., Sigauque I., Macuamule, C., Neves, L., Phenzhorn, B.L., Marcotty, T. e den Bossche, P.V. 2005. The susceptibility of *T. congolense* isolated in Zambezia Province, Mozambique, to isometamidium chloride, diminazene aceturate and homidium chloride. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 72(4): 333-8
19. Mugittu, K.N.; Silayo, R.S; Majiwa, P.A.O.; Kimbita, E.K.; Mutayoba, B.M e Maselle R. (2001). Application of PCR and DNA probes in the characterization of trypanosomes in the blood of cattle in farms in Morogoro, Tanzania. *Veterinary Parasitology* 94. 177-189.
20. Murray, M. (1999). The parasites, predators, places and people I have known: a great adventure. *Veterinary Parasitology*. 81. pp 149-158.
21. Njiokou, F., G. Simo, S.W. Nkinin, C. Laveissière e S. Herder. (2004). Infection-rate of *Trypanosoma brucei* s.l, *T. vivax*, *T. congolense* "forest type", and *T. simiae* in small wild vertebrates in south Cameroon. *Acta Tropica*. 92. pp 139 - 146.
22. Njiru, Z. K., C. C. Constantine, S. Guya, J. Crowther, J. M. Kiragu, R. C. A. Thompson e A. M. R. Dávila. (2005). The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitology Research*. 98 (3) 186-192.
23. OIE. (2004). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 5th edition disponível em <http://www.oie.int/> atualizado a 23. 07. 2004 e consultado a 20. 05. 06.
24. Paris, J., M. Murray e F. McOdimba. (1982). A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomosis in cattle. *Acta Tropica*. 39. pp 307-316.

25. Serveau, C., A. Boulangé, F. Lecaille, F. Gauthier, E. Authié e G. Lalmanach. 2003. Procongoain from *Trypanosoma congolense* Is Processed at Basic pH: An Unusual feature among Cathepsin L-Like Cysteine Proteases. Biol. Chem. Vol. 384, pp. 921 – 927
26. Solano, P., J.F. Michel, T. Lefrançois, S. de La Rocque, I. Sidibé, A. Zoungrana e D. Cuisance. (1999). Polymerase chain reaction as a diagnosis tool for detecting trypanosomes in naturally infected cattle in Burkina Faso. Veterinary Parasitology. 86 95–103
27. Uilenberg G. (1998). A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of african animal trypanosomosis. M-27 ISBN 92-5-104238-1. Rome
28. Urquhart, G. M., J. Armour, J. L. Duncan, A. M. Dunn e F. W. Jennings.(1996) Parasitologia Veterinária. Segunda edição. Guanabara KooGan. 273pp.

Sites:

1. http://paginas.terra.com.br/educacao/biolmol/aula7_PCR-RAPD-aplicar consultado a 20. 05. 06 e sem data de actualização.
2. <http://www.oie.int/>

10. ANEXOS

Anexo A: Classificação de *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma vivax*

Reino Animal
 Filo Protozoa
 Subfilo Sarcomastigophora
 Classe Mastigophora
 Ordem Kinetoplastida
 Família Trypanosomatidae
 Género *Trypanosoma*
 Subgénero *Nannomonas*
 Espécie *Trypanosoma congolense*
 Sinonímia: *Nannomonas congolense*

Reino Animal
 Filo Protozoa
 Subfilo Sarcomastigophora
 Classe Mastigophora
 Ordem Kinetoplastida
 Família Trypanosomatidae
 Género *Trypanosoma*
 Subgénero *Dutonella*
 Espécie *Trypanosoma vivax*
 Sinonímia: *Dutonella vivax*

Anexo B1: Distribuição da mosca tse-tse em África – o cinturão tse-tse.

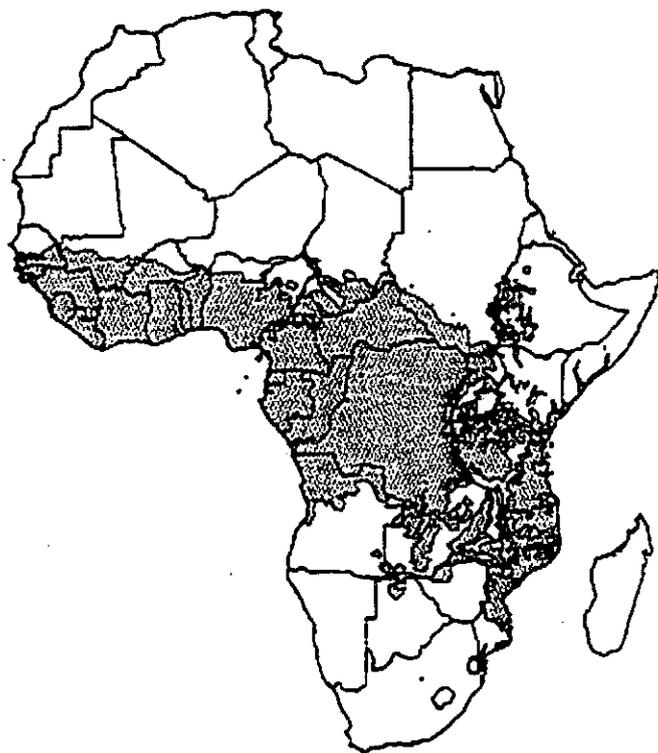


Fig. 1: 37 países são reportados como fazendo parte de um vasto território habitado pela mosca e por isso se tornaram zonas de incidência natural de espécies *Trypanosoma* patogénicos africanos (Fonte: Uilenberg, (1998)

Anexo C1: Efectivo bovino e nível de prevalência da tripanossomose em Moçambique.

Apresentemente, pelos resultados das Prospecções anuais do DINAP, pode-se dizer que a taxa de prevalência de *Trypanosomas* (% de positivos) em Moçambique vem reduzindo, contudo há que ter em conta que esta redução é acompanhada por uma redução da amostragem, apesar do notório aumento do nº de efectivos bovinos.

Ano	Efectivo	Amostragem	% de Amostras	Positivos	% de positivos	Província mais afectada*
1993	213 905	4 726	2.2	655	13.9	Tete
1994	238 969	4 215	1.8	293	13.6	Maputo e Gaza
1995	292 826	4 867	1.7	314	6.5	Inhambane
1996	352 164	-	-	-	-	-
1997	410 532	5 697	1.4	379	6.7	Sofala

* Província com maior nº de efectivos infectados

Anexo C2: Distribuição do efectivo bovino em Moçambique

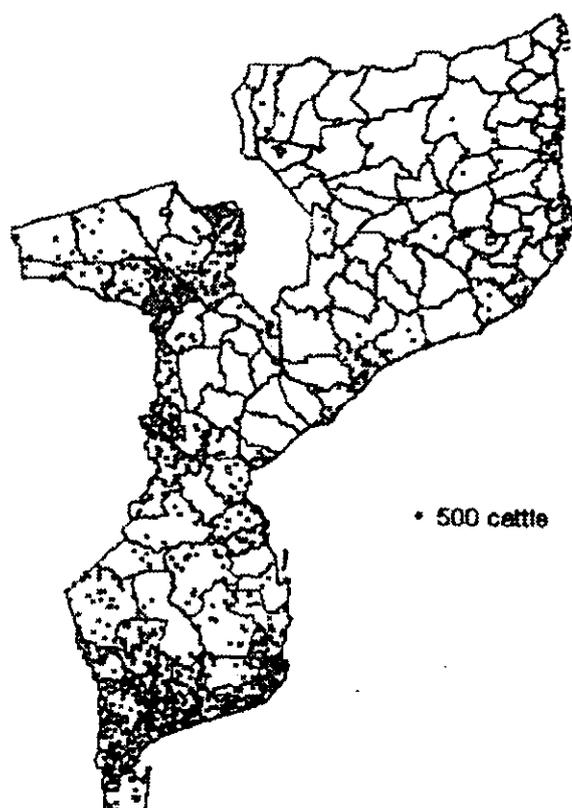


Fig. 3 : Distribuição do efectivo bovino em Moçambique. As regiões livres da tse-tse são as que concentram maior número de cabeças de gado bovino do país (Fonte: Jamal (2005)).

Anexo D1: Algumas características que juntamente com a morfologia ajudam a identificar o *Trypanosoma congolense* e o *T. vivax* em preparações microscópicas frescas (Fonte: Kaufmann, 1996).

Espécie	Flagelo livre	Cinetoplasto	Membrana ondulatória	Tamanho (µm)	Tamanho e motilidade nas preparações
<i>T. congolense</i>	ausente	médio, subterminal, marginal	não proeminente	9 - 18	pequeno aderente aos glóbulos vermelhos pela extremidade anterior
<i>T. vivax</i>	presente	largo e terminal	não proeminente	20 - 26	Largo e extremamente activo; atravessa rapidamente todo o campo microscópico

Anexo D2: Morfologia básica dos *Trypanosoma* e morfologia diferencial de *T. congolense* e *T. vivax*.

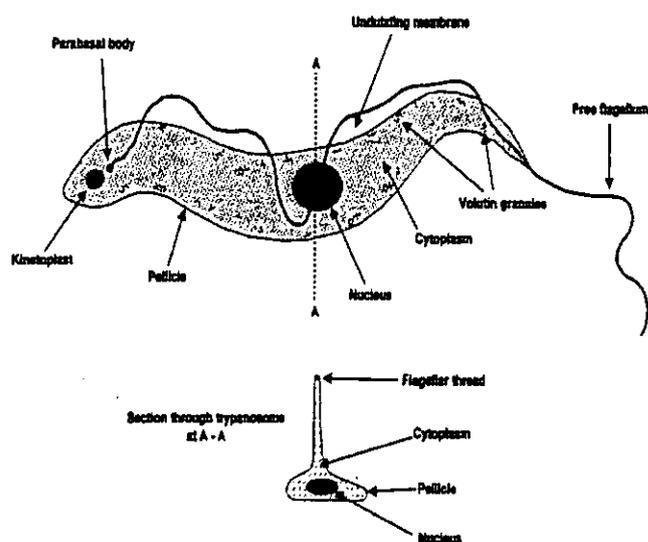


Fig. 4: Características fundamentais de um *Trypanosoma* (trypomastigote) visto em um esfregaço de sangue de um animal infectado. (Fonte: Uilenberg (1998))

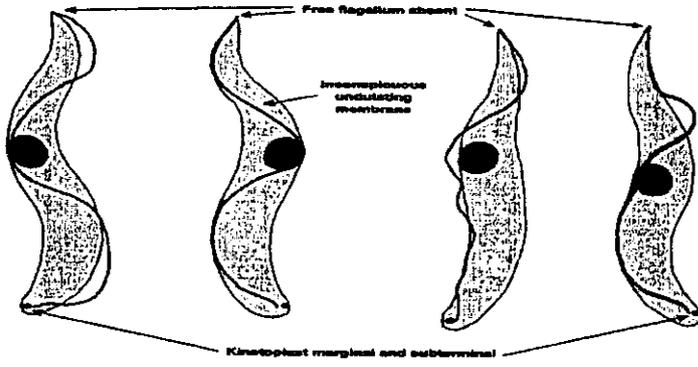


Fig. 5: Diagrama de *Trypanosoma congolense* em um esfregaço de sangue de um animal infectado. (Fonte: Uilenberg (1998))

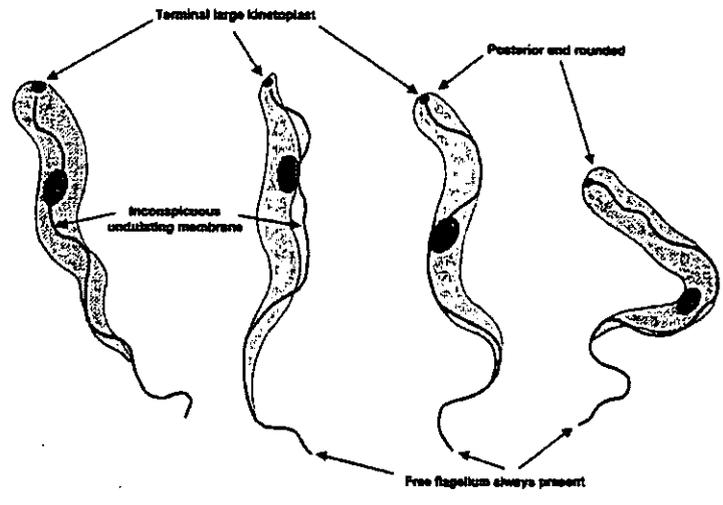


Fig. 6: Diagrama de formas de *T. vivax* comuns no fluxo sanguíneo de animais infectados (Fonte: Uilenberg (1998))

Anexo E1: Protocolo do diagnóstico parasitológico da infecção dos murganhos pelo método de Woo

O método de Woo foi processado segundo OIE (2004) nos seguintes passos:

1. Foi cortada a ponta da cauda do murganho, e desta colectado cerca de 70 μ l de sangue para um tubo capilar de 75 μ l com anticoagulante (heparina), sendo em seguida o tubo lacrado numa das extremidades com plasticina;
2. Colocaram-se os capilares selados na centrífuga de microhematócrito, com as extremidades lacradas viradas para o exterior, sendo os tubos colocados simetricamente para garantir o equilíbrio na centrifuga; Centrifugou-se por 5 min, a 9000 rpm;
3. Após a centrifugação formam-se três camadas distinguíveis: camada inferior de eritrócitos, camada intermédia de leucócitos e a camada superior de o plasma; uma vez que as células parasitárias tem densidade próxima à dos glóbulos brancos elas concentraram-se na interface leucócitos / eritrócitos numa camada não facilmente distinguível. Cortou-se o capilar com caneta de ponta diamante 1mm abaixo do miníscuo de eritrócitos;
4. Recuperou-se a fina camada de eritrócitos, a dos leucócitos e parte do plasma numa lâmina microscópica;
5. Cobriu-se a lâmina com uma lamela e observou-se a preparação ao microscópio óptico a uma ampliação de 400x e estimou-se a população de parasitas nas amostras positivas de acordo com Paris *et al.* (1982).

Anexo E2: Protocolo da amostragem de sangue total

1. Foram marcados tubos eppendorf para cada isolado com parasitemia estimada acima de 5.10^5 tripanossomas/ml pela tecnica de Woo;
2. A cada tubo marcado foram adicionados $\pm 20\mu$ l (uma gota) de citrato de sódio (anticuagulante) com ajuda de uma seringa;

3. Próximo de uma lamparina acesa, e esterilizando sempre todo material cortante e a cauda do murganho com álcool a 70%, foi depois de seca cortada a ponta da cauda do murganho correspondente a cada isolado de *T. congolense* seleccionado e dela expremidas gotas de sangue;
4. Imediatamente as gotas foram sendo recuperadas da ponta da cauda para o respectivo tubo eppendorf com ajuda de uma seringa previamente lavada (por dentro) com citrato de sódio;
5. Os tubos eppendorf contendo as amostras foram conservados a - 20 °C.

Anexo E3: Protocolo da amostragem de sangue em discos de papel de filtro

A amostragem de sangue contendo tripanossomas teve procedimento similar à do sangue total nos primeiros 3 paços, diferindo no restante:

4. Com uma pinça previamente lavada em álcool 70% e seca ao ar livre foi recolhido um disco de papel de filtro e imediatamente impregnado com a gota de sangue na cauda do murganho (bastando para tal encostar o papel à gota); foram empregados completamente 4 discos para cada amostra
5. O disco impregnado foi colocado no respectivo tubo eppendorf e este fechado de imediato;
6. Os eppendorfs foram transferidos para o fluxo laminar previamente ligado e limpo com álcool 70 % e aí deixados *overnight* com as tampas abertas para permitir secagem dos discos.
7. No dia seguinte os eppendorfs foram novamente fechados, retirados do fluxo laminar e conservados a temperatura ambiente até a utilização na extracção de ADN.

Anexo E4: Extracção de DNA a partir de sangue total

(Adaptado de Gonzales *et al.*(2005) citando Clausen *et al.*(1998))

1. Foram descongelados à temperatura ambiente 50 µl do sangue total
2. Ao sangue descongelado foi adicionado 125 µl de PBS e “vortexado” por 15 s; antes da centrifugados a 13200 rpm por 6 min e 30 s;
3. Foi descartado o sobrenadante no produto da centrifugação conservando-se o *pellet*;
4. Foram adicionados 125 µl de PBS e “vortexado” até ressuspender o *pellet* antes da centrifugação nas condições anteriores;
5. Foi novamente descartado o sobrenadante conservando-se o *pellet*;
6. Foram repetidos 4 vezes os passos 4; 5 e 6 (na sequência, até obter um sobrenadante límpido);
7. Foram adicionados ao *pellet* 25 µl de tampão de lise (50 mM KCl, 0.5% Tween 20, 10mM Tris-HCl pH 8) e 1.25 µl de proteinase k (20 mg/ml) e incubados durante a noite a 56 °C;

No dia seguinte os tubos foram incubados por 10min em banho-maria a 100 °C (para desnaturação da proteinase k) e foram feitas mais 2 alíquotas de produto de extracção diluído 10x e 100x respectivamente. Todas alíquotas foram conservadas a - 20 °C até à utilização.

Anexo E5: Extracção de DNA a partir de discos impregnados de sangue

(segundo Gonzales *et al.*(2005) citando Boid *et al.*(1999))

1. Colocar num eppendorf 3 discos de papel de filtro impregnado de sangue amostral;
2. Adicionar 200 µl de água destilada e incubar ½ hora a 37 °C;
3. Centrifugar 10 min a 7800 G;
4. Descartar o sobrenadante (para eliminar a hemoglobina);
5. Ressuspender o disco em 100 µl de água bidestilada e incubar 30 min a 99 °C;
6. Centrifugar nas condições anteriores;

7. Recuperar o sobrenadante noutro tubo limpo. A partir deste foram feitas mais 2 alíquotas de produto de extracção diluído 10x e 100x respectivamente. Todas alíquotas foram conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até utilização.

Anexo E6: Parasitémias estimadas de acordo com o nível de diluição de ADN

Segundo Boid *et al.* (1999), na extracção de sangue total recupera-se quase a totalidade do ADN na amostra e perde-se boa parte (cerca de 50 % ou mais) dos tripanossomas na extracção por fervura de disco, quando se descarta o primeiro sobrenadante. Deste modo, o ADN não diluído extraído de sangue total corresponde à parasitémia de 5.10^6 tripanossomas/ml e o extraído por fervura de disco à $= 5.10^5$ tripanossomas/ml. Assim pode-se presumir as seguinte ordem decrescente de parasitémia¹ de acordo com o método de extracção e o nível de diluição do ADN:

- 1° Sangue total (não diluído)
- 2° Boiling de discos (não diluído)
- 3° Sangue total (diluído 10x)
- 4° Boiling de discos (diluído 10x)
- 5° Sangue total (diluído 100x)
- 6° Boiling de discos (diluído 100x)

¹ Esta parasitémia pode estar subestimada particularmente em relação à extracção de ADN por fervura (*Boiling*) de discos impregnados, pois não se sabe qual o exacto nível de perda de tripanossomas.

Observações

Note-se a não detecção de *T. vivax* no PCR ITS1, e a não confirmação da infecção supostamente mista em nenhum dos PCRs.

Nenhum dos suspeitos *T. congolense* tipo Kilifis de acordo com o PCR ITS 1 (as amostras cujo produto de amplificação tem 650 pb) amplificou com o PCR Cat L.

Exceptuando as amostras 11 e 13 que apresentavam alta parasitemia (10^4 - 5.10^5 tripanossomas/ml e 5.10^5 - 5.10^6 tripanossomas/ml respectivamente), todos outros falsos negativos em um ou ambos PCRs apresentavam baixas parasitêmias (amostras 1, 8 e 16 com 10^3 - 10^4 tripanossomas/ml e amostras 7, 12, 18, 20 e 21 com 10^2 - 10^3 tripanossomas/ml)

A única amostra negativa no buffy coat (amostra 19) confirmou-se negativa em ambos PCRs a que foi submetida.