

Avaliação da sensibilidade de protocolos da pcr convencional utilizados para detecção e tipagem do *Trypanosoma cruzi*

Elisama Loubak¹; Max Jean de Ornelas Toledo², Mônica L. Gomes²

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde; ²Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. E-mail: elisama_loubak@hotmail.com

Na fase crônica da doença de Chagas a baixa parasitemia é predominante levando a busca de métodos alternativos mais eficazes para detecção do *T. cruzi* do que os parasitológicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR), tem mostrado bom desempenho para esse propósito. O objetivo do trabalho foi avaliar a sensibilidade de diferentes protocolos utilizados para detecção e tipagem do *T. cruzi* utilizando como estratégia experimentos de reconstituição com quantidades conhecidas de parasitos e amplificação pela PCR convencional do DNA mitocondrial (minicírculo - PCR/330 e PCR/COII do kDNA de *T. cruzi*) e DNA nuclear (RNA ribossomal - rRNA). Formas epimastigotas de *T. cruzi* pertencentes à DTU TcI (cepa PR-150) foram cultivadas em meio LIT e mantidas a 28°C. A partir de uma suspensão de 10⁶ parasitos/ml o DNA foi extraído e resuspenso em 150 µl de Tris-EDTA, sendo que 1 µl dessa suspensão corresponde a 6.666,7 flagelados. A partir dessa suspensão o DNA foi diluído 1:100 de 1/10² até 1/10¹⁴. O DNA foi quantificado utilizando NanoDrop. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida e revelados pela prata. A quantidade mínima de parasitos capaz de ser detectada pela PCR/330 foi 0.0000666 flg (1/10⁸). Para PCR/COII e rRNA o limite de detecção e tipagem foi de 6.666,7 flgs correspondente ao DNA total sem diluição. Os resultados mostram que o alvo convencionalmente utilizado para detecção do *T. cruzi* é muito mais sensível do que os alvos utilizados para tipagem desse parasito e que a presença de bandas de baixa intensidade no gel de poliacrilamida correspondem a mínimas frações do parasito e que estes resultados podem ser considerados positivos.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Detecção e tipagem molecular, Sensibilidade.

Apoio: PROAP-CAPES