

Valutazione di due kit commerciali per l'analisi in Real-Time PCR di *T. cruzi*

Formenti F. , Angheben A. , Bisoffi Z. e Perandin F.

Centro per le Malattie Tropicali, Ospedale Sacrocuore, Negrar, Verona

Introduzione: La malattia di Chagas è causata dal protozoo *Trypanosoma cruzi*. L'infezione può essere acquisita attraverso la puntura di una cimice (genere *Triatoma*, Fig. 1), trasfusioni di sangue, trapianto d'organo, per via congenita e per ingestione di cibo contaminato dalle feci della cimice infetta. La malattia può evolvere in due forme: acuta, che si manifesta immediatamente dopo l'infezione e cronica, che si manifesta dopo molti anni (cardiomiopatia, megasindrome digestiva, compromissione del sistema nervoso centrale). La diagnosi tradizionale si avvale dell'emocoltura e della xenodiagnosi, procedure laboriose che richiedono molto tempo e hanno il limite di una scarsa sensibilità nei casi di bassa parassitemia. Negli ultimi anni la PCR (Polymerase Chain Reaction) ha dato una grande svolta nella rilevazione del DNA di patogeni in campioni clinici ed è stata applicata anche per identificare *T. cruzi* direttamente nel sangue. Tuttavia tale metodica si è dimostrata molto variabile per sensibilità e specificità; questo è dovuto a numerosi fattori come, volume di campione analizzato, metodo di conservazione del campione, metodo utilizzato per isolare il DNA, sequenza nucleotidica analizzata, impiego di PCR "home-made".



Fig.1: *Triatoma* sp

Scopo: Valutare due sistemi Real-Time PCR commerciali per confrontarne la sensibilità.

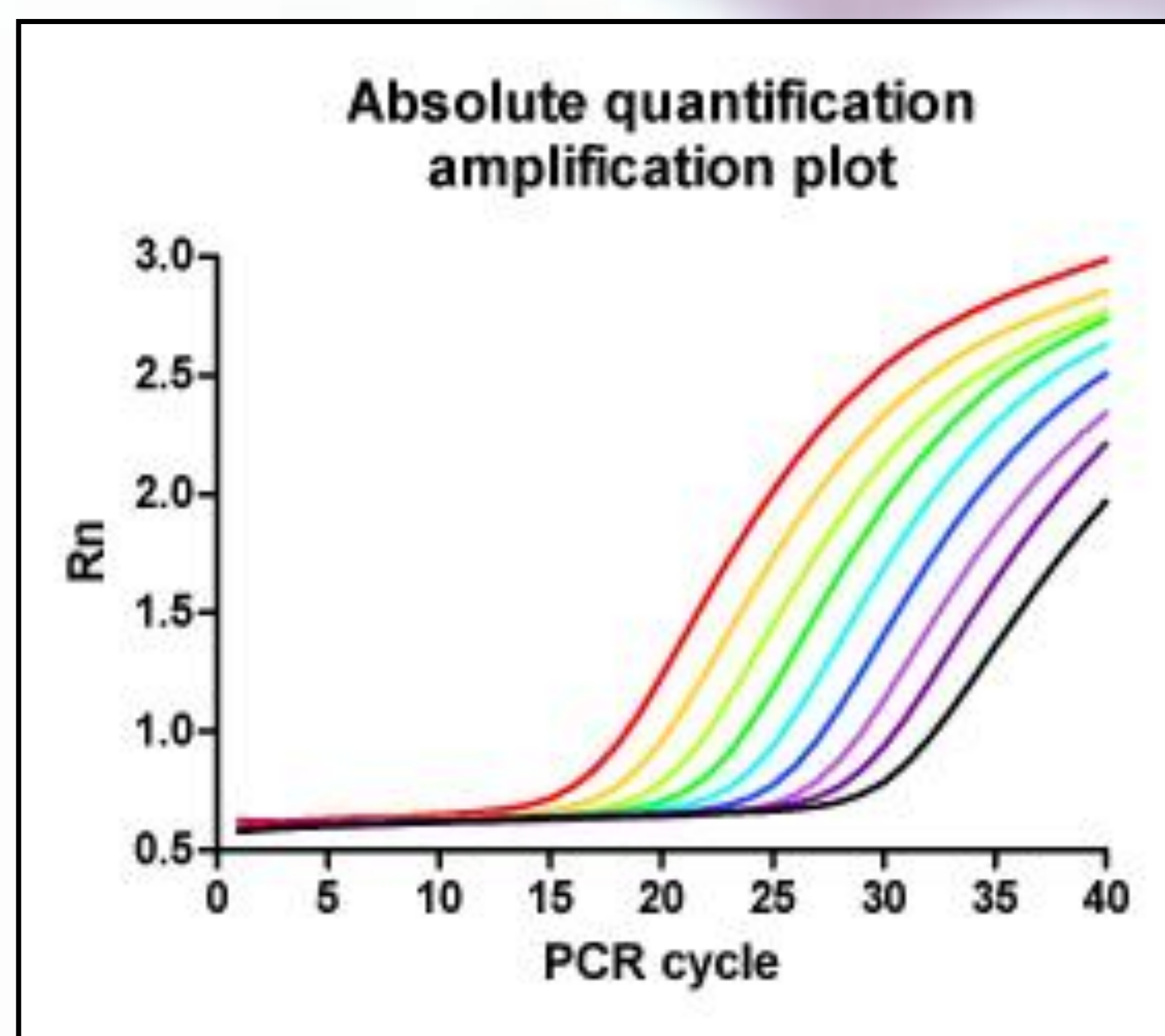


Fig.2: Grafico di amplificazione in Real Time PCR

Metodi: Nello studio sono stati presi in considerazione 14 campioni di sangue positivi per *T. cruzi* per dimostrata presenza del parassita; 13 sono stati conservati in Guanidina 6M ed uno in EDTA a -80°C. Dei 13 campioni in Guanidina, 3 sono stati forniti da CEADES - Salud y Medio Ambiente, Universidad Mayor de San Simon (Cochabamba, Bolivia) e i rimanenti 10 sono stati forniti dal Centro Nazionale di Microbiologia Carlo III (Madrid, Spagna). Il campione conservato in EDTA proveniva da un paziente ricoverato presso il Centro Malattie Tropicali di Negrar (Verona).

Tutti i campioni sono stati estratti con il sistema automatico MaGnaPure LC.2 (Roche) utilizzando il KIT DNA-I. In ciascun campione è stato messo un controllo esogeno di estrazione/presenza di inibitori (PhHV). L'eluato (100 µl) è stato utilizzato per le reazioni di amplificazioni in Real-time PCR (TaqMan) (Fig. 2), seguendo le istruzioni riportate nel kit. Ciascun kit prevede l'amplificazione di un controllo interno e di un controllo positivo di amplificazione. I due sistemi commerciali saggiati sono: Quantification of *Trypanosoma cruzi* (Genesig PrimerDesign, England) e CHAG-U (Progenie Molecular, Valencia).

Risultati: 9 su 14 campioni amplificati con kit Molecular Progenie sono risultati positivi, mentre solo 1 è risultato positivo quando amplificato con kit Genesig-PrimerDesign.

Conclusioni:

Attualmente il panorama commerciale dei kit per diagnosi molecolare di Chagas è molto scadente; i pochi kit disponibili peccano di scarsa sensibilità; mentre nel mondo della ricerca esistono miriadi di differenti approcci (differenti target amplificati) per cui non si riesce a standardizzare un protocollo. L'organizzazione Mondiale della Sanità sta lavorando per costruire un pannello di campioni biologici di riferimento per la valutazione dei test molecolari a disposizione. Non sono noti tuttora però i risultati di una valutazione indipendente. Alcuni studi hanno posto a confronto diverse metodiche home-made per cercare di giungere ad una standardizzazione delle tecniche ma ulteriori passi vanno fatti in questa direzione. I risultati ottenuti in questo studio preliminare offrono ulteriore conferma di ciò.

Campione	Genesig PrimerDesign (Ct)	Progenie Molecular (Ct)
1*	neg	neg
2	neg	pos (29)
3	pos (33.51)	pos (26)
4	neg	pos (20.99)
5	neg	pos (31)
6	neg	pos (34)
7	neg	pos (34.43)
8	neg	pos (34.13)
9	neg	neg
10	neg	neg
11	neg	neg
12	neg	neg
13	neg	pos (38.90)
14	neg	pos (33.54)

Tabella 1. Risultati dall'analisi in Real Time PCR utilizzando i due diversi kit di amplificazione "Genesig PrimerDesign" e "Progenie Molecular".

*: campione conservato in EDTA

Bibliografia:

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(1)

Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7)

Schijman AG1, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão P, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Methods C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto T, Luqueti A, Ladzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jan 11;5(1)

Buekens P, Cafferata ML, Alger J, Althabe F, Belizán JM, Carlier Y, Ciganda A, Dumonteil E, Gamboa-Leon R, Howard E, Matute ML, Sosa-Estani S, Truyens C, Wesson D, Zuniga C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: study protocol. *Reprod Health.* 2013;11(10)