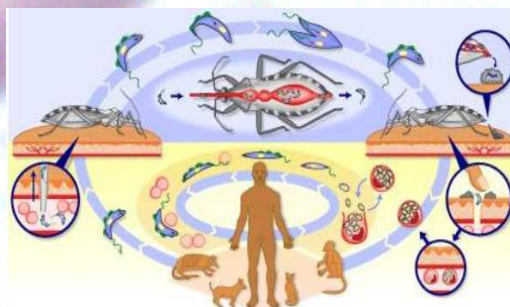


# Valutazione comparativa di un kit commerciale e di un sistema in home di Real time PCR per la diagnosi di *T. cruzi*

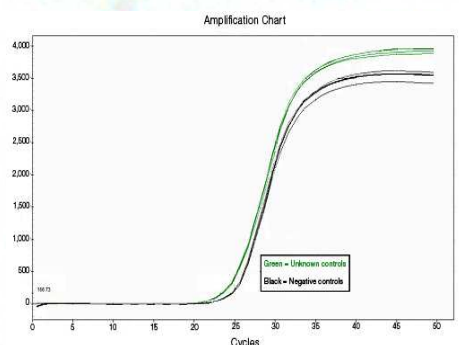
<sup>1</sup>Perandin Francesca, <sup>2</sup>Antonelli Alberto, <sup>1</sup>Formenti Fabio, <sup>3</sup>Angheben Andrea, <sup>2,4,5,6</sup>Rossolini Gian Maria, <sup>1,3</sup>Bisoffi Zeno

<sup>1</sup>UO Microbiologia e SAELMT, Ospedale Sacrocuore-Don Calabria, Negrar, Verona; <sup>2</sup>Dip. di Medicina Sperimentale e Clinica, Univ. di Firenze; <sup>3</sup>Centro per le Malattie Tropicali, Ospedale Sacrocuore-Don Calabria, Negrar, Verona; <sup>4</sup>UO Microbiologia e Virologia, AOU Careggi; <sup>5</sup>Fondazione Don Gnocchi, Firenze; <sup>6</sup>Dip. di Biotecnologie Mediche, Univ. di Siena

**Introduzione:** Il *Trypanosoma cruzi* è un parassita che viene trasmesso all'uomo attraverso le feci di alcune specie di cimici. Altre vie di infezione sono la trasfusione di sangue, il trapianto d'organo, la trasmissione congenita, il consumo di cibi o bevande contaminate dal parassita. L'infezione causa la malattia di Chagas, con una fase acuta (parassitemica) e una cronica (che coinvolge apparati, principalmente cardiaco e gastroenterico). La diagnosi di laboratorio avviene mediante osservazione microscopica (fase acuta), con metodi sierologici e con PCR. Quest'ultima è molto utile nei casi di riattivazione dell'infezione e nel seguire i pazienti in terapia, ma la sua sensibilità dipende molto dal tipo di PCR utilizzata. Un recente studio internazionale ha validato una Multiplex PCR, che ha come target sia il DNA satellite (SAT) che il DNA del kinetoplasto (K) di *T. cruzi*, indicandola come PCR di riferimento (Ramirez JC *et al*). Commercialmente sono presenti kit in Real time PCR (RT-PCR) per la diagnosi molecolare del parassita.



**Scopo:** In questo studio è stato messo a confronto il sistema proposto da Ramirez JC *et al* con il kit della ditta Progenie Molecular, che ha come target il DNA SAT.



**Metodi:** 101 campioni di sangue in EDTA sono stati raccolti da altrettanti pazienti con sierologia positiva per *T. cruzi* e congelati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'estrazione del DNA. Quest'ultima è stata eseguita con l'estrattore MagnaPure LC 2.0 (Roche). La RT-PCR in home (h-RT-PCR), è stata eseguita come descritto da Ramirez JC *et al*; i controlli positivi e il controllo interno sono stati forniti dal Dr. Schijman AG. Su tutti i DNA risultati positivi e su 20 DNA risultati negativi in h-RT-PCR è stata eseguita l'amplificazione con il kit Progenie.

**Risultati:** La h-RT-PCR ha rivelato la presenza del DNA di *T. cruzi* in 8 su 101 campioni di sangue. Di questi, 4 campioni sono risultati positivi per entrambi SAT e K DNA, mentre 4 solo per K. Il metodo commerciale ha individuato solamente i 4 campioni positivi per SAT/K alla h-RT-PCR.

**Conclusioni:** Il sistema h-RT-PCR si è dimostrato il metodo più sensibile. La minor sensibilità del kit commerciale potrebbe essere dovuta al fatto che amplifica un solo target. Per cui se il clinico/laboratorio conosce la provenienza dei suoi pazienti può orientarsi nella scelta del kit in quando è riportato in letteratura che la regione SAT è target preferenziale per genotipi di *T. cruzi* I,II, III e IV (presenti prevalentemente in Colombia, Messico e Brasile), mentre per i genotipi V e VI (presenti prevalentemente in Argentina e Bolivia) è preferibile amplificare la regione K.

Campione	in home SAT/K PCR (ct)	Real Time Progenie (ct)
1	neg/neg	NEG
2	neg/neg	NEG
3	neg/neg	NEG
4	neg/neg	NEG
5	neg/neg	NEG
6	neg/pos (35,63)	NEG
7	neg/neg	NEG
8	neg/neg	NEG
9	neg/neg	NEG
10	neg/neg	NEG
11	neg/neg	NEG
12	neg/pos (37,25)	NEG
13	neg/neg	NEG
14	pos (29,26)/pos (29,74)	pos (29,48)
15	neg/neg	NEG
16	pos (32,61)/pos (32,11)	pos (30,11)
17	neg/neg	NEG
18	neg/neg	NEG
19	pos (28,89)/pos (34,32)	pos (30,44)
20	neg/neg	NEG
21	neg/neg	NEG
22	pos (27,82)/pos (33,14)	pos (27)
23	neg/neg	NEG
24	neg/neg	NEG
25	neg/pos (31,08)	NEG
26	neg/pos (31,06)	NEG
27	neg/neg	NEG
28	neg/neg	NEG

## Bibliografia:

- Ramirez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Ramirez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chávez MD, Muñoz-Calderón A, Pérez-Morales D, Santalla J, Marcos da Matta Guedes P, Peneau J, Marcet P, Padilla C, Cruz-Robles D, Valencia E, Crisante GE, Greif G, Zulantay I, Costales JA, Alvarez-Martínez M, Martínez NE, Villarreal R, Villarreal S, Sánchez Z, Bisio M, Parrado R, Maria da Cunha Galvão L, Jácome da Câmara AC, Espinoza B, Alarcón de Noya B, Puerta C, Riarte A, Diosque P, Sosa-Estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Britto C, Yadón ZE, Schijman AG. Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. *J Mol Diagn*. 2015 Sep;17(5):605-15
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velázquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadón 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, Velázquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, 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, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti 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, Truysen C, Wesson D, Zuniga C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina, Honduras, and Mexico: study protocol. *Reprod Health*. 2013;11(10)