

***Trypanosoma cruzi*: otimização da reação em cadeia da polimerase (PCR) no diagnóstico da doença de Chagas crônica e caracterização molecular de cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos no noroeste do Paraná**

Os primeiros relatos do uso da PCR no diagnóstico da infecção chagásica crônica mostrou uma sensibilidade variando de 90 a 100% em relação aos testes sorológicos. Posteriormente, níveis de sensibilidade bem inferiores foram observados de 45 e 60% demonstrando a necessidade de estudos adicionais para comparar a PCR com os outros métodos utilizados no diagnóstico da doença de Chagas crônica. Neste estudo, nos propusemos a otimizar a PCR, fazendo algumas modificações na extração do DNA e nas condições da reação em relação aos protocolos correntemente descritos na literatura e ainda avaliar, juntamente com a hemocultura e lise mediada pelo complemento (LMCo), a sua capacidade de diagnosticar indivíduos com sorologia positiva, negativa ou inconclusiva para doença de Chagas. Foi proposto também a caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos residentes no noroeste do Paraná por RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) e SSR-PCR (Simple Sequence Repeat-anchored PCR).

O nível de sensibilidade detectada para a PCR foi de 10fg de DNA do *T. cruzi* revelado com sais de prata e 0,1fg após hibridização em *Slot-Blot* com sonda específica, correspondendo a um parasita intacto ou 0,01% do fragmento do kDNA circulando no sangue de hospedeiro infectado. No protocolo estabelecido para o diagnóstico da infecção chagásica crônica foi utilizado uma única reação e um pequeno volume final (20µl) de reação. Quando a técnica foi avaliada para cada grupo estudado demonstrou resultado positivo em 83,5% dos indivíduos com sorologia positiva, 29,4% para os de sorologia negativa e 46,2% para os indivíduos apresentando sorologia duvidosa.

***Trypanosoma cruzi*: use of an optimized PCR method in chronic Chagas disease diagnosis, and molecular characterization of strains isolated from chronic chagasic individuals living in northwest Paraná, Brazil**

The first reports of PCR use in diagnosing chronic Chagas' disease described sensitivity levels ranging from 90%-100% compared to serologic tests. Later, significantly lower sensitivity levels of 45%-60% were reported, which illustrates the need for additional studies to compare PCR to other methods in chronic Chagas disease diagnosis.

This study proposes the use of an optimized PCR technique, which modifies DNA extraction and reaction conditions that are currently described in the literature. This new protocol is compared to hemoculture and complement mediated lysis (CoML) in diagnosing individuals with positive, negative or inconclusive serologic results for Chagas disease. Furthermore, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) and SSR-PCR (Simple Sequence Repeat-anchored PCR) are used to characterize *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic individuals living in northwest Paraná, Brazil.

The optimized PCR method detected 10fg of *T. cruzi* DNA revealed through silver salts, and 0.1 fg after Slot-Blot hybridization with specific probe, corresponding to an intact parasite or 0.01% of the kDNA fragments circulating in the blood of an infected host. The protocol used a single, small volume (20µl) reaction. Using this method, infection was detected in 83.5% of individuals with positive serology, 29.4% of individuals with negative serology and 46.2% of individuals with inconclusive serology.

For the first time, PCR was compared to CoML. CoML was positive for 84.8%, 32.4% and 38.5% of individuals who had positive, negative and inconclusive serologic results, respectively. PCR and CoML were highly correlated independent of the groups studied which suggests that it could be used to monitor cure in chronic

Pela primeira vez a PCR foi comparada com a LMCo. Esta reação apresentou 84,8%, 32,4% e 38,5% para os indivíduos dos grupos sorologia positiva, negativa e duvidosa, respectivamente. Quando comparada com a PCR mostrou uma boa correlação independente do grupo estudado. Isto sugere que a PCR possa ser utilizada como método de controle de cura de pacientes chagásicos crônicos após tratamento específico.

A PCR foi positiva em 29 indivíduos com hemocultura positiva e ainda confirmou a infecção chagásica em mais 37 indivíduos com hemocultura negativa, mostrando uma sensibilidade maior em relação a este teste parasitológico no grupo sorologia positiva.

De um modo geral, a PCR mostrou boa correlação com os outros testes quando cada grupo foi considerado, no entanto, mesmo utilizando um protocolo altamente sensível não fomos capazes de detectar todos os casos cuja a sorologia convencional indicava infecção chagásica. Isto mostra que a PCR embora muito melhor que os testes parasitológicos também tem sensibilidade limitada em indivíduos com parasitemia muito baixa ou intermitente.

A caracterização das cepas de *T. cruzi* isoladas dos indivíduos chagásicos crônicos mostraram uma alta similaridade nos perfis de RAPD e SSR-PCR formando um grupo geneticamente bem correlacionado, sugerindo que o hospedeiro possa ter selecionado variedades específicas de clones do *T. cruzi* de populações de parasitas inicialmente mistas. Além disso, nenhuma correlação pode ser estabelecida entre os perfis de RAPD e SSR-PCR de acordo com a origem geográfica das cepas.

chagasic patients who have received specific treatment.

PCR was positive for 29 individuals with positive hemoculture and confirmed infection in 37 individuals with negative hemoculture. PCR had a higher sensitivity level than hemoculture among individuals in the positive serology group.

Overall, PCR was well correlated with other tests when each study group was analyzed. However, even with a highly sensitive protocol, PCR was not able to detect infection in all of the positive conventional serology cases. This illustrates that while PCR is much better than parasitologic tests in detecting infection, it has limited sensitivity in individuals with very low or oscillating parasitemia levels.

T. cruzi strains isolated from chronic chagasic individuals formed a genetically well-correlated group in RAPD and SSR-PCR profiles, suggesting that hosts may have selected specific varieties of clones from an initially mixed infective population of parasites. The RAPD and SSR-PCR profiles did not reveal a correlation related to geographic origin of the strains.

Mônica Lúcia Gomes

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas
da Universidade Federal de Minas Gerais para
obtenção do Título de Doutor.

Belo Horizonte, MG, Brasil, 1997.