

Reação da polimerase em cadeia na doença de Chagas crônica: emprego de dois pares de iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36 em isolados de *Trypanosoma cruzi* de sangue de pacientes e em outros tripanosomatídeos

Polimerase chain reaction in chronic Chagas' disease: use of two pairs of TCZ1/TCZ2 and S35/S36 primers in isolates of *Trypanosoma cruzi* of blood from patients and in other trypanosomatids

Considerando as dificuldades existentes para o diagnóstico e controle de tratamento de pacientes na fase crônica da doença de Chagas, constituem objetivos do presente trabalho: 1) Estudar a sensibilidade e especificidade da Reação da polimerase em cadeia (PCR) com dois pares de oligonucleotídeos iniciadores, TCZ1/TCZ2, que amplificam uma seqüência repetitiva de 188 pares de bases do DNA genômico do *Trypanosoma cruzi* e S35/S36, que amplificam uma seqüência repetitiva de 330 pares de bases do DNA do cinetoplasto, 2) Verificar a freqüência com que estes iniciadores reconhecem seqüências repetitivas de DNA de amostras de isolados de *T. cruzi* a partir de sangue de pacientes de várias regiões do Brasil. Para estudar a sensibilidade, foram analisados DNA de formas epimastigotas de cepa Y de cultura de *T. cruzi* em diferentes diluições com e sem adição de DNA humano. A presença de seqüências conservadas em amostras de *T. cruzi* foi estudada em 23 isolados a partir de hemocultura e xenodiagnóstico provenientes de sangue de pacientes com doença de Chagas crônica, sem e com co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana. Visando estudar a especificidade, DNA de diferentes tripanosomatídeos, *T. rangeli*, *T. brucei*, *T. conorhini*, *T. theileri* e *L. mexicana* e *L. chagasi* foram empregados na PCR e em hibridização. Com as PCR realizadas com os iniciadores TCZ1/TCZ2 e S35/S36, chegou-se a sensibilidade de até 5fg de *T. cruzi*, equivalente a 0,022 moléculas do parasito, havendo discreta queda na sensibilidade quando adicionado 1µg de DNA humano na amostra a ser amplificada para 10 (0,045 moléculas) e 50fg (0,22 moléculas), respectivamente. Registrou-se

In chronic Chagas' disease the difficulty in detecting the parasite *Trypanosoma cruzi* or the parasite antigen both for diagnosis and for follow-up after treatment constitutes an important problem in medical practice. To address this problem we studied the polimerase chain reaction-based method for the detection of *T. cruzi* product in samples from chagasic patients. We analyzed the sensitivity and specificity of the PCR with two pairs of primers: one pair (TCZ1/TCZ2) which amplifies a repetitive sequence of 188 base-pairs from genomic DNA of *T. cruzi* and another pair (S35/S36) which amplifies a repetitive sequence of 330 base-pairs from kinetoplast DNA of *T. cruzi*. We studied the efficacy of these primers in detecting *T. cruzi* DNA sequence from *T. cruzi* isolates obtained from blood samples of patients from different regions of Brazil. Initially DNA of epimastigotes, Y strain was used to study the sensitivity of primers for detection of *T. cruzi* DNA. The sensitivity of the detection with PCR was 5fg with both pairs of primers, which is equivalent to 0.022 parasites DNA molecules. A slight decrease in sensitivity was observed when 1µg of human DNA was added to the samples, the detection level changing to 10fg (0.045 molecules) with primers TCZ1/TCZ2 and to 50fg (0.22 molecules) with primers S35/S36. The presence of conserved sequences in *T. cruzi* samples was verified in 23 isolates obtained from hemoculture and xenodiagnosis samples of patients with Chagas' disease, some of them carriers of human immunodeficiency virus. DNA sequences from all isolates obtained from patients was amplified with both pairs of primers, the limit of detection being in the range of 5-50fg. Eighty seven per cent of isolates hybridized using well known TCZP probe

também que ambos iniciadores amplificaram 100% dos isolados de *T. cruzi* a partir de sangue de pacientes. Observou-se um limite de detecção de DNA de *T. cruzi* de 5 a 50fg (0,022 a 0,22 moléculas do parasito) com três desses isolados. Pode-se observar com a sonda TCZP (Jones et al, 1993) que 87% dos isolados hibridizaram e com a sonda Y1, 78,3%. Com o emprego do produto amplificado da cepa Y como sonda houve hibridização em 100 % dos isolados. No estudo da especificidade, observou-se amplificação de duas cepas de *T. rangeli* (0,8µg) e de *L. mexicana* (0,4µg) e *L. chagasi* (0,4µg) com os iniciadores TCZI/TCZ2 e hibridização das mesmas cepas de *T. rangeli* com a sonda TCZP. Os iniciadores S35/S36 e a sonda Y1 foram mais específicos não amplificando outros tripanosomas que não o *T. cruzi*, porém na PCR houve amplificação com DNA de *L. mexicana* (0,2 e 0,4µg) e *L. chagasi* (0,2 e 0,4µg). O produto amplificado da cepa Y utilizado como sonda hibridizou com DNA de *T. brucei* e *T. theileri* amplificados com S35/S36. O estudo demonstrou boa sensibilidade dos pares de iniciadores empregados sem a necessidade de hibridização e reconheceu seqüências dos isolados de pacientes de diversas áreas geográficas. Os iniciadores TCZI/TCZ2 reconhecem seqüências de DNA mais freqüentemente entre os tripanosomatídeos examinados do que S35/S36.

and 78,3% with Y1 probe. When the amplified product of Y strain was used as probe, 100% hybridization was noticed with the isolates. To study the specificity, other trypanosomatids of genus *Trypanosoma* and *Leishmania* were used. Amplification of DNA sequences from two strains of *T. rangeli* (0.8mg), *Leishmania mexicana* (0.4µg) and *Leishmania chagasi* (0.4µg) was observed using TCZI/TCZ2. The same *T. rangeli* strains were hybridized with TCZP probe. The primers S35/S36 and probe Y1 were more specific and no amplification of DNA from other species of *Trypanosoma* was observed. However, important amplification occurred in PCR with DNA samples from *L. mexicana* (0.2/0.4µg) and *L. chagasi* (0.2/0.4µg). Hybridization with DNA from *T. brucei* and *T. theileri* occurred when the amplified product of Y strain was used as probe. We can conclude that both primers in PCR used in this study have good sensitivity to detect sequences of *T. cruzi*. Further hybridization procedure with *T. cruzi*-derived probes is more expensive and technically more difficult, therefore would be employed only in some restricted cases. These primers recognized sequences present in *T. cruzi* isolates of patients from different regions of Brazil. S35/S36 primers were more specific to *T. cruzi* than TCZI/TCZ2, which also recognized other trypanosomatids.

Ana Angélica Bulcão Portela Lindoso
Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção
do Título de Mestre.
São Paulo, SP, Brasil, 1998