



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA PROVINCIA DE
CHOAPA. ESTUDIO TRANS-GENERACIONAL
EPIDEMIOLÓGICO, INMUNE HUMORAL Y
PARASITOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma
cruzi* EN GRUPOS FAMILIARES MATERNOS.**

KAREN NAVARRETE MORALES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

FINANCIADO POR EL PROYECTO DI-SAL 05/17-2, PROYECTO FONDECYT 1080445 Y
PROYECTO 06/2009 REGIÓN VALONA DE BRUSELAS- BELGICA.

SANTIAGO, CHILE
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA PROVINCIA DE CHOAPA. ESTUDIO TRANS-GENERACIONAL EPIDEMIOLÓGICO, INMUNE HUMORAL Y PARASITOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* EN GRUPOS FAMILIARES MATERNOS.

KAREN NAVARRETE MORALES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : WERNER APT BARUCH
PROFESOR CONSEJERO: HECTOR ALCAÍNO
PROFESOR CONSEJERO: PEDRO CATTAN

SANTIAGO, CHILE
2008

Quisiera agradecer, de corazón, a todas las personas que cooperaron durante la realización de esta memoria de título; en especial, a aquellas, que de manera desinteresada, trabajan día a día por hacer de los centros de salud un lugar más digno, confortable y humano: Hospital de Illapel, Hospital de Salamanca, Consultorio Canela Instituto de Salud Pública Chile (ISP), Laboratorio de Parasitología Básico Clínico de la Fac. de Medicina. Universidad de Chile y Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Hago un agradecimiento especial a mis padres, familiares y amigos, quienes siempre han creído en mí y me han dado su apoyo incondicional en todo momento; sin ellos no estaría ahora aquí.

A todos ustedes muchas gracias y que Dios les bendiga.

Karen

INDICE

	Página
RESUMEN.....	10-11
SUMMARY.....	12-13
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15-24
a. Generalidades del <i>T. cruzi</i>	16
b. Ciclo biológico.....	18
c. Mecanismos de transmisión de <i>T. cruzi</i>	20
d. Manifestaciones clínicas.....	21
e. Diagnóstico de laboratorio.....	22
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVO GENERAL.....	25
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
VI. MATERIAL, SUJETOS Y MÉTODOS.....	26-29
a. Conformación de grupos familiares.....	26
b. Encuesta epidemiológica.....	26
c. Obtención de material biológico.....	27
i. Sangre periférica	
ii. Xenodiagnóstico	
d. Reacción de Inmunofluorescencia indirecta.....	27
e. Reacción de ELISA.....	28
f. Reacción de PCR.....	28
VII. RESULTADOS.....	30-41
A. Resultados Grupo de estudio.....	30
B. Resultados Grupo control.....	33
C. Resultados encuesta epidemiológica	
1) Encuesta epidemiológica en madres chagásicas.....	37
2) Encuesta epidemiológica en abuelas chagásicas.....	39
3) Encuesta epidemiológica en madres negativas.....	40

a la infección con T. cruzi (Grupo control)

D.	Resultados estudio clínico.....	41
VIII.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42-48
IX.	DISCUSIÓN.....	49-55
X.	CONCLUSIONES.....	56
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	66-72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1	15
Mapa epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Chile. Área del Estudio Transgeneracional.	
Figura 2	19
Ciclo evolutivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	
Figura 3	33
Detección de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados en sangre periférica de madres chagásicas y sangre de cordón de RN con los primers 121-122.	
Figura 4	43
Distribución de serologías positivas pesquisadas en grupos familiares. Provincia Choapa.	
Figura 5	44
Porcentajes de casos positivos pesquisados en las abuelas maternas de 32 grupos familiares, según serología y exámenes parasitológicos (XD y PCR) para <i>T. cruzi</i> . Grupo estudio y grupo control. Provincia Choapa. IV Región.	
Figura 6	61
Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.	
Figura 7	62
Placas con diluciones para Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.	
Figura 8	64
Tubos marcados con las diluciones para IFI	
Figura 9	65
Fotografía de inmunofluorescencia indirecta (IFI) observada mediante microscopio de IFI. (Reacción negativa y positiva).	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 130

Distribución de 10 madres chagásicas procedentes de Salamanca, Provincia de Choapa, IV Región, Chile; sus hijos menores o igual a un año, mayores a un año y abuelas maternas, según serología, xenodiagnóstico y PCR para enfermedad de Chagas. (Enero 2005 a julio 2006).

Tabla 231

Distribución de 12 madres chagásicas procedentes de Illapel, Provincia de Choapa, IV Región, Chile; sus hijos menores o igual a un año, mayores a un año y abuelas maternas, según serología, xenodiagnóstico y PCR para enfermedad de Chagas. (Enero 2005 a julio 2006).

Tabla 332

Distribución de 10 madres chagásicas procedentes de Canela, Provincia de Choapa, IV Región, Chile; sus hijos menores a un año, mayores a un año y abuelas maternas, según serología, xenodiagnóstico y PCR para enfermedad de Chagas (Enero 2005 a julio 2006).

Tabla 434

Distribución de 9 madres procedentes de Salamanca, Provincia de Choapa, IV Región, Chile; sus hijos menores o igual a un año, mayores a un año y abuelas maternas, según serología, xenodiagnóstico y PCR para enfermedad de Chagas. (Enero 2005 a julio 2006).

Tabla 535

Distribución de 14 madres procedentes de Illapel, Provincia de Choapa, IV Región, Chile; sus hijos menores o igual a un año, mayores a un año y abuelas maternas, según serología, xenodiagnóstico y PCR para enfermedad de Chagas. (Enero 2005 a julio 2006).

Tabla 6	36
Distribución de 9 madres procedentes de Canela, Provincia de Choapa, IV Región, Chile; sus hijos menores a un año, mayores a un año y abuelas maternas, según serología, xenodiagnóstico y PCR para enfermedad de Chagas (Enero 2005 a julio 2006).	
Tabla 7	43
Tabla de contingencia Madre Serología * Abuela Serología	
Tabla 8	44
Tabla de contingencia Madre Serología * Abuela PCR	
Tabla 9	45
Tabla de contingencia Madre Serología * Caso Índice Serología	
Tabla 10	45
Tabla de contingencia Madre Serología * Caso Índice PCR	
Tabla 11	46
Tabla de contingencia Madre Serología * Hermano Serología	
Tabla 12	46
Tabla de contingencia Madre Serología * Localidad	
Tabla 13	47
Tabla de contingencia Caso Índice Serología * Localidad	
Tabla 14	47
Tabla de contingencia Abuela Serología * Localidad	
Tabla 15	48
Tabla de contingencia Hermano Serología * Localidad	

ANEXOS

ANEXO 1.....57-60

Ficha epidemiológica para la provincia de Choapa.
Pacientes con serología positiva para la infección por
T. cruzi.

ANEXO 2.....61-65

Protocolo de Inmunofluorescencia indirecta para
diagnostico serológico de enfermedad de Chagas.

RESUMEN

La incorporación de Chile en el programa INCOSUR, para la eliminación de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas, ha contribuido en que la transmisión vertical adquiriera mayor relevancia en nuestro país. El presente estudio aborda la infección familiar por *T. cruzi* de probables casos congénitos no diagnosticados al parto.

El grupo en estudio estuvo conformado por 32 mujeres chagásicas que habitan localidades urbanas o rurales de las comunas de Salamanca, Illapel y Canela, en la Provincia del Choapa, IV Región de Chile, además por sus hijos menores o iguales a un año (C.I.), sus hijos mayores de un año (hermanos de C.I.) y las abuelas maternas. De esta misma forma, se conformó el grupo control, pero a partir de 32 mujeres serológicamente negativas a la infección. El parto de estas mujeres ocurrió entre enero 2005 y julio 2006, en todas ellas se confirmó la infección por *Trypanosoma cruzi* mediante serología convencional (ELISA e IFI IgG) durante sus controles de embarazo. Todo caso serológicamente positivo pesquisado en estos grupos familiares y confirmado por el ISP, fue estudiado mediante Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), Xenodiagnóstico (XD) y encuesta epidemiológica.

En el grupo estudio, compuesto por 141 personas en total, de las cuales 138 fueron evaluadas en aspectos serológicos, parasitológicos y epidemiológicos, encontramos que el 62,5% de las madres chagásicas presentó PCR positivo y en ninguna de ellas obtuvimos un XD positivo. En cuanto a las abuelas de estos grupos familiares, pesquisamos 20 casos serológicamente positivos (71,4% de las abuelas), en 8 de ellas se encontró PCR positivo y solo 2 tenían XD positivo. Se encontraron 2 casos de niños serológicamente positivos; uno corresponde a un niño nacido en el periodo (3,1% de C.I. positivos) y el otro a uno de los 46 hijos >1 año (un 2,2% serológicamente positivos en hermanos de C.I.). Ambos niños poseen madre y abuela con serología positiva para *T. cruzi* y entre ellos no existe parentesco alguno. Además, sus madres poseen PCR positivo.

En el grupo control, con un total de 107 personas de las cuales 105 fueron evaluadas, todas las madres resultaron negativas a la infección con *T. cruzi* tanto serológica como parasitológicamente. No encontramos casos serológicamente positivos en los hijos de las categorías \leq a 1 año (C.I.), ni en $>$ de 1 año (hermanos C.I.). En cuanto a las abuelas de

estos grupos familiares, pesquisamos 7 casos con serología positiva (30,4% de infección chagásica en abuelas), 2 abuelas tenían PCR positivo.

La encuesta epidemiológica evidenció notables diferencias entre la información recogida entre el grupo estudio y el grupo control; en cuanto a calidad de vivienda, conocimiento y exposición al vector y antecedentes familiares de la enfermedad de Chagas, lo que supone la utilidad de la aplicación de la encuesta epidemiológica para estudios de grupos familiares

Mediante el presente trabajo queda demostrado que mediante pesquisa serológica y parasitológica retrospectiva y seriada, es posible detectar casos de transmisión vertical no detectados al parto (C.I.). Por otra parte, debido a la presencia de *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai* en la zona, es imposible descartar la transmisión vectorial en los casos positivos encontrados (diferentes a C.I.). La enfermedad de Chagas constituye una entidad que afecta al grupo familiar, por lo que debería ser abordada multidisciplinariamente. La educación para la salud, la vigilancia epidemiológica medio ambiental y clínica en esta zona hiperendémica constituyen los pilares fundamentales del control de la transmisión de la enfermedad de Chagas en esta región de Chile.

SUMMARY

The incorporation of Chile to INCOSUR for the elimination of vector and transfusional Chagas disease transmission has contributed that vertical transmission acquire higher importance in our country. This investigation study family infection by *Trypanosoma cruzi* of probable congenital cases not diagnosed at delivery.

The study group was constituted by 32 chagasic women of rural and urban zones of the communities of Salamanca, Illapel and Canela of the Choapa Province, IV Region of Chile and their children of less or equal to one year (IC), their children of more than one year (brothers of IC) and the maternal grand mothers. The control group was constituted by 32 women with negative serology. The delivery of these women took place between January 2005 and July 2006. In all of them the infection with *T. cruzi* was confirmed by conventional serology (ELISA and IF IgG) during the pregnancy controls.

All the positive serology cases inquired in the family groups were confirmed by the Institute of Public Health and by polimerase chain reaction (PCR), xenodiagnosis (XD) and epidemiological inquest.

The study group were constituted by 141 individuals in total, 138 of them were evaluated by serology, parasitologically and epidemiologically. We found that 62.5% of the chagasic mothers had a positive PCR, none of them had a positive XD. In relation to the grandmothers of this family groups, we inquired 20 positive serological cases, (71.4% of the grandmothers), 8 of them had positive PCR and only two positive XD. Two children had positive serology, one was a child born in the period (3.1% of IC positives) and the other was one of the 46 children > 1 year (2.2% of IC brothers were serologically positive). Both children had a mother and a grandmother with positive serology, between them there is no family relationship. HeR mothers had positive PCR.

In the control group with a total of 107 persons from which 105 were evaluated, all the mothers were negative to *T. cruzi* infection, serologically and parasitologically. We didn't find positive cases by serology in the children \leq 1 year (IC), none in the > 1 year (brothers of the IC). In relation of the grandmothers of the family groups, we found 7 cases with positive serology (30.4% of infection in the grandmothers), 2 grandmothers had positive PCR. The epidemiological inquest

demonstrated differences between the information obtained in the study and the control group, in relation to the quality of dwelling, knowledge and exposition to the vector, and family antecedents of Chagas disease, which demonstrate the utility of the epidemiological inquest in family studies. By this investigation we demonstrated that by retrospective serological and parasitological studies it is possible to detect vertical transmission not detectable during delivery (IC). By other side the presence of infected *Triatoma infestans* and *Mepraia spinolai* in the zone impede to discard vectorial transmission in the positive founded cases (different to IC). Chagas disease is a entity which affect the family group, for this reason it must be studied multidisciplinary. Health education epidemiological environmental and clinical surveillance in the hyperendemic zone are the fundamental pillars for the control of the transmissions of Chagas disease in this region of Chile.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria cuyo agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Constituye uno de los principales problemas de Salud Pública en Latinoamérica, con alta implicancia médica, social y económica. En la actualidad se estima que en Chile existen aproximadamente 145.000 individuos infectados en la zona endémica, comprendida entre la I y la VI Región, incluida la Región Metropolitana (OPS, 2006).

T. cruzi es transmitido al hombre y alrededor de 150 especies de mamíferos por insectos hematófagos (Noireau, 1999). En Chile, existen tres especies de triatomíneos que participan como vectores de la enfermedad, *Triatoma infestans* en el ciclo doméstico de transmisión, *Mepraia spinolai* y *M. gajardoi* en el ciclo silvestre (Frías *et al.*, 1998; Canals *et al.*, 2000).

Gracias a la participación de nuestro país en el Programa Intergubernamental del Cono Sur (INCOSUR) para la eliminación de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas, se ha podido certificar a Chile como el segundo país que ha interrumpido esta transmisión en 1999 (OPS, 2006). En relación a la transmisión transfusional, la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en donantes de sangre es obligatoria en toda la zona endémica (Schenone *et al.*, 1995). Por este motivo, el mecanismo de transmisión transplacentario ha adquirido mayor importancia en la epidemiología de la enfermedad de Chagas (Schenone, 1999).

En base a lo anteriormente expuesto, se inicia en el año 2006 un estudio piloto de transmisión vertical por *T. cruzi* en la Provincia del Choapa, IV Región, siendo uno de los objetivos establecer la actual prevalencia de infección chagásica en la mujer embarazada y la incidencia de Chagas congénito en hijos de madres chagásicas.

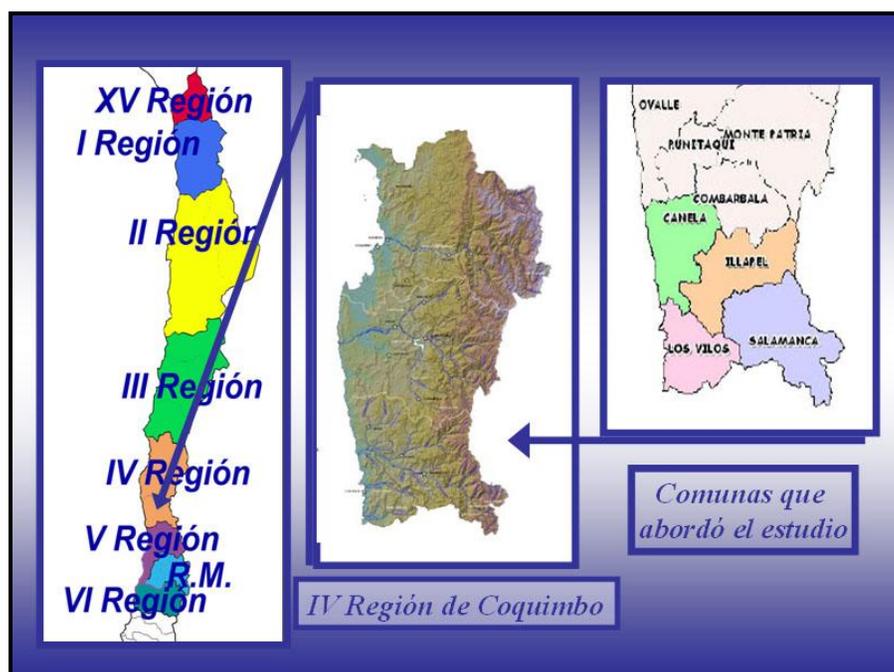
Un aspecto de interés que abordó el presente estudio, es la infección familiar por *T. cruzi* en la línea materna, es decir, probables casos congénitos no diagnosticados al momento del parto. Para descartar otros mecanismos de transmisión, se aplicó una encuesta epidemiológica al grupo familiar.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas existe desde tiempos remotos en el continente americano. Se ha planteado que el parásito causante de la enfermedad, circuló primero en mamíferos y vectores silvestres para luego adaptarse al ciclo doméstico de transmisión, hecho favorecido por el desarrollo de la vida sedentaria de las tribus precolombinas y la construcción de viviendas más duraderas.

La extensión territorial en que se distribuye *T. cruzi* y sus vectores (insectos triatomíneos, comúnmente llamados “vinchucas”) comprende desde el Sur de los Estados Unidos (35° N.), hasta Chile y Argentina (34,5° S. en Chile y 45° S. en la región patagónica Argentina). Se han encontrado evidencias de su presencia en comunidades indígenas que poblaron el extremo norte de Chile, (quebrada de Tarapacá) hace 3500 años. Al analizar muestras de tejidos momificados se ha logrado recuperar DNA de *Trypanosoma cruzi*, aplicando la Reacción de la Polimerasa en Cadena (PCR) en cuatro de seis muestras analizadas (Ferreira *et al.*, 2000).

Figura 1
MAPA EPIDEMIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
EN CHILE Y ÁREA DEL ESTUDIO TRANS-GENERACIONAL



En Chile, el área endemo-enzoótica de la enfermedad de Chagas se distribuye en sectores rurales y periurbanos de las seis primeras regiones político-administrativas, más la Región Metropolitana, y la XV Región de Arica y Parinacota, siendo las regiones III y IV consideradas hiperendémicas (Schenone *et al.*, 1995).

a. Generalidades del *Trypanosoma cruzi*

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi*, fue descrito por primera vez por Carlos Chagas en 1909, en Minas Gerais, Brasil. Pertenece al Orden Kinetoplastida y es miembro de la Familia Trypanosomatidae. Los Kinetoplastida son protozoos flagelados con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar, generalmente contienen una estructura prominente y paraflagelar conocida como kinetoplasto y que corresponde a una condensación de DNA localizado en el interior de su única mitocondria que está ramificada por todo el cuerpo del parásito. El kinetoplasto de *T. cruzi* se ubica cerca de la base del flagelo, y corresponde a una red de maxicírculos (20 kpb) y minicírculos (1.4 kpb) dentro del mitocondrion. El DNA kinetoplastídico (kDNA) representa entre un 10-20% DNA total del parásito. Su genoma es relativamente superior al de otros parásitos (100-200x 10⁶ pb) (Brener *et al.*, 2000).

T. cruzi es un hemoflagelado compuesto de poblaciones heterogéneas, que circulan entre la especie humana, animales domésticos y reservorios silvestres (Fernandes *et al.*, 1997).

Los primeros estudios que demostraron la complejidad estructural de *T. cruzi* se realizaron mediante métodos bioquímicos que analizaron los productos de la expresión génica. Por medio de electroforesis de isoenzimas utilizadas como marcadores, se pudo apreciar diferencias entre enzimas que poseían propiedades catalíticas similares. Entre los años 1977 y 1978, Miles *et al.* analizaron seis loci en *T. cruzi* y los resultados llevaron a sugerir la existencia de tres esquizodemas, que denominaron zimodemas z1, z2 y z3; El zimodema Z1 circula entre animales y triatominos de origen selvático mientras que Z2 se asocia al ciclo doméstico de transmisión, siendo aislado desde humanos y animales domésticos. Finalmente el zimodema Z3 que fue aislado desde personas autóctonas de Brasil y comparte el ciclo selvático.

Por otra parte, el análisis de estas aloenzimas mediante electroforesis (zimogramas) y el estudio de los fragmentos de restricción de kDNA (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) han demostrado un marcado polimorfismo entre poblaciones naturales de *T. cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 1988). Los parásitos que exhiben el mismo patrón de RFLP pertenecen a un mismo esquizodema. Diferentes grupos de investigadores han reportado una estrecha correlación entre zimodemas y esquizodemas, sugiriendo que los genes estructurales nucleares que codifican enzimas y el DNA extranuclear (kDNA) han tenido una evolución paralela (Montamat *et al.*, 1999). Otros estudios del genoma de *T. cruzi* han demostrado la existencia de una alta representación de genotipos en relativamente pocos multilocus, ya que al analizar 121 aislados de *T. cruzi*, extraídos de diferentes áreas geográficas, se observó que el 93% de los 15 loci estudiados fueron polimorfos, con un promedio de 5,14 alelos por locus. Se detectaron 43 genotipos, de los cuales solo 16 fueron detectados más de una vez (Tibayrenc *et al.*, 1986).

Estos hallazgos en conjunto hicieron sugerir que las poblaciones de *T. cruzi* poseen una estructura clonal, siendo estos clones estables en el tiempo y espacio, lo que permite estudiarlos como marcadores epidemiológicos. En 1999, se acordó en la Reunión Satélite de Río de Janeiro la existencia de dos grandes divisiones en aislados de *T. cruzi*, los cuales podrían tener subespecies: las Tipo I (Z1, isoenzimas 1-25) y Tipo II (Z2, Z3, isoenzimas 26-43). En estudios posteriores se determinó que el Tipo II debería ser subdividido en 5 linajes (IIa-IIe) o DTUs (Discrete typing units) (Brisse, *et al.* 2000)

Luego de estos extensos estudios de genética poblacional del *T. cruzi*, en diversos países de Sudamérica incluso Chile, surge con mayor fuerza aún la teoría de estructura clonal para las poblaciones de este parásito. Investigaciones empleando técnicas de hibridación de DNA y análisis de esquizodemas (RFLP), concuerdan con la caracterización mediante isoenzimas y apoyan la hipótesis de clonalidad, lo que implica que los marcadores específicos del kDNA y del DNA nuclear son transmitidos en conjunto a la progenie (Carreño *et al.*, 1987; Solari *et al.*, 1992; Venegas *et al.*, 1997). Hasta el año 2001, la mayoría de los trabajos realizados le otorgaba una importancia mínima al intercambio sexual (si es que existía realmente) en la estructura génica y evolutiva del parásito, pero ese año otros estudios demostraron la existencia de eventos de recombinación, principalmente en genes mitocondriales y sugirieron la existencia de cuatro linajes que no necesariamente coinciden con los ya reportados (Machado *et al.*, 2001).

Todo lo anteriormente señalado nos reafirma que *T. cruzi* esta constituido por una población heterogénea, de estructura básicamente clonal compuesta por un conjunto de cepas que circulan en los ciclos doméstico y selvático incluyendo humanos, vectores y reservorios animales (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc, 2003). Esta amplia diversidad podría implicar características biológicas distintivas entre las poblaciones estudiadas, las cuales incidirían en los eventuales efectos patológicos, vulnerabilidad a drogas y vacunas y otras características de importancia médica (Miles *et al.*, 1977; Dvorak, 1984; Ayala, 1993; Fonseca y Romanha, 1999).

b. Ciclo biológico

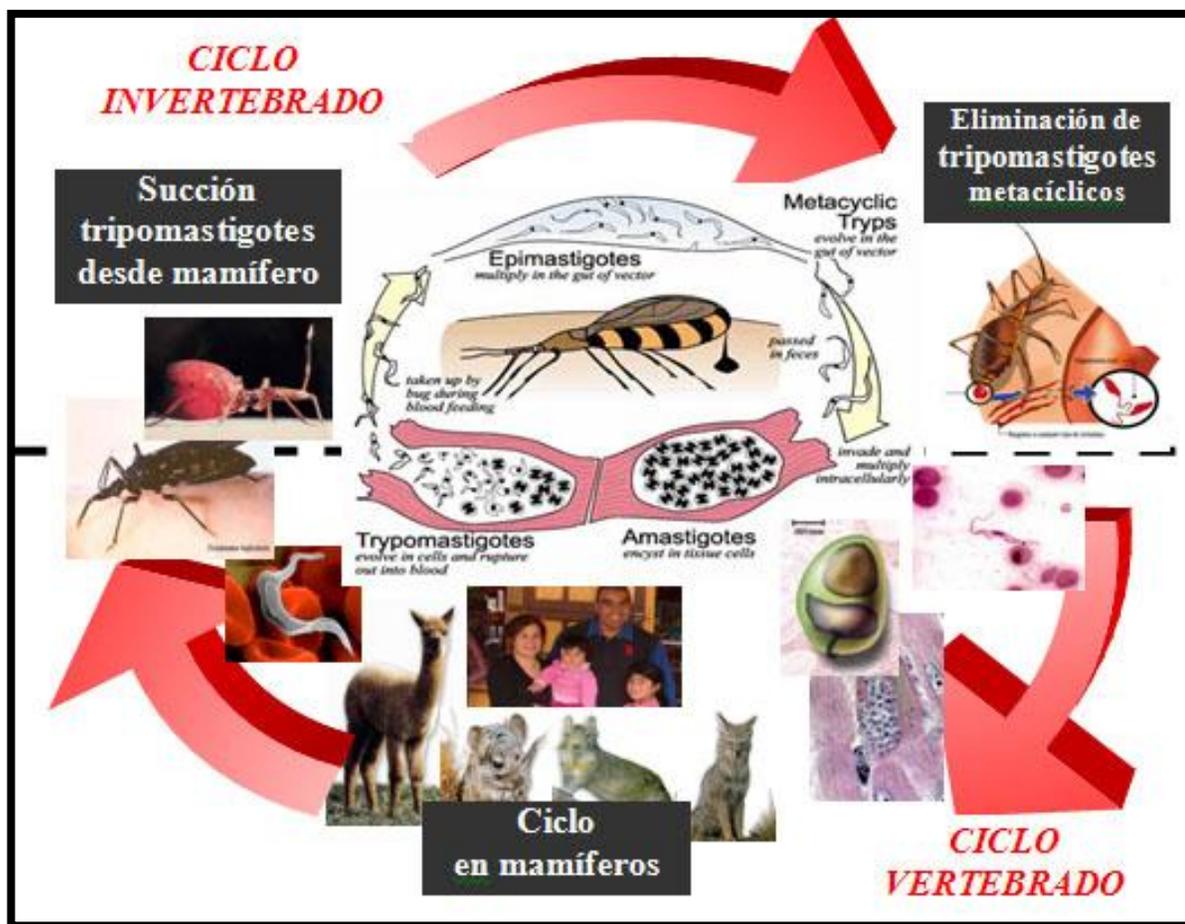
El *T. cruzi* es un parásito unicelular que alterna su vida entre dos hospedadores multicelulares: un invertebrado y un vertebrado. Bajo condiciones naturales, *T. cruzi*, infecta más de 150 especies de mamíferos de diferentes órdenes y se transmite a través de hemípteros hematófagos de la Familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, popularmente conocidos como vinchucas (Noireau, 1999). De los 16 géneros distintos que son susceptibles a la infección por *T. cruzi*, los más importantes son *Pastronylus*, *Rhodnius* y *Triatoma* (Goble, 1970; Pinto, 1990).

El ciclo biológico comienza cuando el hospedador invertebrado, insecto triatomino, ingiere sangre con formas tripomastigotes de *T. cruzi* desde mamíferos infectados. Al llegar al estómago del insecto, las formas tripomastigotes se transforman en esferomastigotes y epimastigotes. Luego los parásitos migran hacia el intestino, donde se multiplican muy activamente en el lumen como formas epimastigotes (Brenner *et al.*, 2000). Las formas epimastigotes se unen por interacciones hidrofóbicas al epitelio del intestino medio y posterior, y también a la capa cuticular del epitelio de la glándula rectal y del saco rectal, lo que se observa 8 días después de la infección (Schaub y Böker., 1987) y, al cabo de 15 a 30 días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatoma. Cuando el insecto pica al mamífero, emite deyecciones con formas tripomastigotes y epimastigotes, que son inoculadas en la piel o mucosas del vertebrado (mamífero). Los epimastigotes son rápidamente fagocitados mientras que los tripomastigotes penetran en cualquier tipo celular, menos en neutrófilos y eosinófilos, ubicándose en una vacuola intracelular llamada “parasitófora”. En el interior de la célula los tripomastigotes se transforman a la forma amastigote y ahora libres en el citoplasma,

después de 35 hrs. de inoculados, comienza el proceso de fisión binaria y cuando llegan a un número cercano a las 500 amastigotes, sincronizadamente se transforman a tripomastigotes. El flagelo de esta forma evolutiva comienza con un movimiento que se cree es responsable de la ruptura de la célula hospedera, liberando estos tripomastigotes que podrían invadir células cercanas o salir al torrente sanguíneo y distribuirse por el cuerpo del hospedero vertebrado (Brener *et al.*, 2000).

Figura 2

Ciclo evolutivo de *Trypanosoma cruzi*



En Chile existen dos ciclos de transmisión para *T. cruzi*, cada uno de ellos dependiente de una especie diferente de triatomino: el silvestre, se relaciona con *M. spinolai*, insecto autóctono de nuestro país (Canals *et al.*, 2000), que generalmente involucra hospederos vertebrados animales y el otro es el ciclo doméstico, dependiente de

Triatoma infestans, que se encuentra en el área domiciliaria y peridomiciliaria e involucra a humanos y animales domésticos (Apt y Reyes, 1990).

c. Mecanismos de transmisión de *T. cruzi*:

El principal mecanismo de transmisión de *T. cruzi* es a través del vector triatomino (que representa entre un 80-90% de la transmisión), pero también existe transmisión transfusional y transplacentaria o congénita; excepcionalmente por trasplante de órganos e infecciones accidentales de laboratorio (Schenone *et al.*, 1985; Apt y Reyes 1986; Wendell *et al.*, 1992).

En 1991, parte la Iniciativa de los países del Cono Sur para la eliminación de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas (OPS, 2006), lo que aumenta el interés en ella haciendo obligatorio en Chile, a partir de 1996, el tamizaje en donantes de sangre en la zona endémica, lo cual también aumenta las notificaciones (Schenone *et al.*, 1995).

Durante el año 1998 fueron 553 los casos notificados, lo que representa una tasa de 3,8 por 100.000 habitantes. De éstos, se puede observar que el 80% corresponde solamente a casos pesquisados mediante serología, no existiendo signología clínica ni nexos epidemiológico, lo que permite inferir que el 80% de las notificaciones corresponde a donantes de sangre, es decir, el aumento en la notificación de casos positivos a la infección con *T. cruzi* se debería principalmente a dos factores: al aumento de tamizaje en donantes, que queda de manifiesto en el alto porcentaje de diagnósticos serológicos (80%) y por otra parte, al incentivo debido al programa de eliminación de la transmisión vectorial y transfusional (Olea, 1998). No obstante ser la enfermedad de Chagas de declaración obligatoria, esto no se cumple en la práctica, por consiguiente existe una subnotificación importante.

La enfermedad de Chagas congénita es la infección del recién nacido, con examen parasitológico directo y/o reacción de PCR positiva, hijo de madre chagásica. En Latinoamérica la tasa de transmisión de la infección congénita por *T. cruzi* varía entre el 1% y el 12%, en Brasil, Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay (Carlier y Torrico, 2003).

d. Manifestaciones clínicas:

La etapa inicial de la enfermedad de Chagas se caracteriza por una elevada parasitemia debido a que las formas tripomastigotes circulantes en sangre diseminan la infección en un incremento exponencial de parásitos intracelulares y sanguíneos (Fase Aguda). El parasitismo, eventualmente decae por la respuesta inmune del hospedero y gradualmente la parasitemia patente de fase aguda evoluciona a una parasitemia subpatente (Pinto, 1990; Wendell *et al.*, 1992; Brener *et al.*, 2000). Superada esta etapa, el hospedero puede permanecer sin sintomatología alguna, es decir, en una fase indeterminada o asintomática. En esta fase crónica hay niveles bajos de parasitemia lo que dificulta el diagnóstico parasitológico. Mientras un 70% de los casos pueden permanecer asintomáticos toda su vida, el otro 30% desarrolla cardiomiopatías de lenta evolución y que puede llevar a la muerte de los pacientes por insuficiencia cardíaca, trastornos de la conducción y graves arritmias. Por otra parte, se pueden desarrollar visceromegalias a nivel de esófago y colon (Brener *et al.*, 2000).

En la transmisión vertical de *T. cruzi* al feto en formación, el parásito puede pasar transplacentariamente en cualquier etapa del desarrollo gestacional, así como también, en embarazos sucesivos y gemelares. Generalmente se producen fetopatías, pero no abortos y el niño recién nacido (RN) puede ser aparentemente sano y de peso adecuado a su edad gestacional (90% de los casos), pero también puede presentar cuadros que pudieran llegar a ser mortales (10% de los casos), con neonatos de bajo peso, prematuros con hepatoesplenomegalia y otros síntomas característicos del síndrome de TORCH (Infección materna que afecta al feto en gestación, producida por una serie de agentes infecciosos virales, parásitos y otros, que se han agrupado bajo la sigla TORCH: toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus, herpes y enfermedad de Chagas) (Torrice *et al.*, 2004).

T. cruzi alcanza la circulación fetal por vía hematogena, como resultado de una placentitis, donde se encuentran focos inflamatorios agudos y/o crónicos, áreas de necrosis, presencia de células gigantes y parasitismo de las células trofoblásticas y de macrófagos, constituyendo cuadros de vellositis e intervallositis de intensidad variable; también el parásito puede penetrar en forma activa hacia la circulación fetal. (Torrice *et al.*, 2004). No existe una correlación directa entre el grado de parasitismo placentario e infección fetal. Puede haber gran cantidad de parásitos en la sangre materna sin haber transmisión transplacentaria (Bittencourt, 1992).

Se ha planteado que la severidad del cuadro congénito podría deberse al polimorfismo que presentan las poblaciones de *T. cruzi*; pero estudios recientes realizados en Bolivia demuestran que ni la ocurrencia ni el desarrollo de formas clínicas severas se debe al polimorfismo del ADN de *T. cruzi*. (Virreira *et al.*, 2006). Por otra parte, por medio del estudio de la actividad y el fenotipo de las células Natural Killers, de sangre de cordón umbilical de recién nacidos congénitamente infectados, se pudo apreciar que las células CD56 no solo disminuyeron en número, sino que también exhibieron una capacidad defectuosa para producir interferón gamma. Esta falla en la función del efecto citotóxico se asocia con una expresión reducida de receptores de superficie, todo lo anterior podría indicar que *T. cruzi* es capaz de modular la respuesta inmune (Hermann *et al.*, 2006).

Existe consenso que ante la detección de un caso congénito este debe tratarse, ya que se ha demostrado una negativización de la serología y la parasitemia, que es mayor mientras más precoz se inicie el tratamiento.

La intervención de la transmisión transplacentaria por *T. cruzi* ha tenido limitaciones, debido a dificultades en el diagnóstico, esquemas inadecuados o poco claros de seguimiento y fundamentalmente, a que la gran mayoría de los recién nacidos (RN) infectados son asintomáticos y por consiguiente subdiagnosticados.

e. Diagnóstico de laboratorio:

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas se basa en demostrar la presencia de *T. cruzi* mediante pruebas directas, aplicadas fundamentalmente en la fase aguda de la infección. Las más utilizadas son: examen microscópico de sangre al fresco, microstrout, gota gruesa y xenodiagnóstico (OPS, 2006; Apt *et al.*, 2006).

El estudio parasitológico de la infección chagásica en nuestro país, se ha efectuado principalmente a través de xenodiagnóstico (XD), debido a la carencia de otros métodos más eficaces para detectar *T. cruzi* en la sangre de individuos infectados (Schenone *et al.*, 1995). Este método presenta una mayor sensibilidad en individuos jóvenes y con infección reciente. De esta manera, se han reportado sensibilidades en grupos etáreos menores de 10 años del 60,8% y 75%. En la infección crónica, en cambio, se ha reportado una sensibilidad de 49,3%. Su rendimiento aumenta significativamente a medida que aumenta el número de cajas utilizadas (Schenone, 1999). Una de las desventajas del XD, es el período que transcurre para obtener un resultado, que varía entre 30 y 120 días (Noireau, 1999). Debido

a que en el período crónico de la enfermedad la parasitemia disminuye a niveles subpatentes, la utilidad de las pruebas directas se ve limitada, siendo en esta etapa de elección los métodos indirectos que detectan anticuerpos específicos contra el parásito, tales como la Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA IgG (Brener *et al.*, 2000).

Desde hace algunos años, la técnica de PCR ha sido introducida en nuestro país como método de diagnóstico parasitológico en las diferentes etapas de la enfermedad de Chagas, permitiendo no solamente detectar la presencia de *T. cruzi* en la sangre sino también caracterizar las cepas circulantes (Noireau, 1999). La técnica de PCR ha permitido optimizar el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* amplificando ADN desde regiones altamente repetidas del genoma de *T. cruzi*, constituyéndose en una promisoriosa herramienta para ser utilizada en el diagnóstico y evaluación terapéutica de la infección (Zulantay *et al.*, 2004; Apt *et al.*, 2005). Numerosos estudios realizados en la última década han evidenciado que la técnica de PCR en muestras de sangre de individuos infectados posee mayor sensibilidad en relación a otras técnicas de diagnóstico parasitológico, tales como XD y hemocultivo (Solari *et al.*, 2001). La técnica de PCR permite un diagnóstico temprano, fácil y confiable de infección congénita, con muestreos que se obtienen antes que la madre y el recién nacido abandonen la maternidad (Virreira *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2005).

En la actualidad no existen datos epidemiológicos fidedignos de la infección congénita en nuestro país, por lo que no se conoce realmente la magnitud e importancia que ha adquirido este mecanismo de transmisión, ni los alcances del mecanismo vertical en niños menores de 10 años (etapa crónica reciente) (Luquetti *et al.*, 2005).

Diversos autores sugieren que la enfermedad de Chagas congénita debe ser abordada en forma multidisciplinaria dentro de un grupo familiar. En Salta-Argentina, se realizó un estudio a 340 niños que nacieron de madres crónicamente infectadas y en 31 de ellos, se demostró la infección por *T. cruzi*. Se estableció además, la prevalencia de transmisión congénita en los hermanos, tanto para los del caso índice infectado (IIC) como para los no infectados (NIIC), la cual resultó ser de 31,4% (32 de 102 niños), no encontrándose ningún infectado en las familias NIIC. Además, en 4 familias se demostró la transmisión de segunda generación (de abuela a la madre y de madre al recién nacido), por lo que se plantea que en hermanos de un RN infectado con *T. cruzi*, debería realizarse el diagnóstico aún en ausencia de síntomas (Sánchez *et al.*, 2005).

Por lo tanto, es de suma importancia abordar cada caso de infección congénita por *T. cruzi* de manera integral, ya que existiría una alta probabilidad de que los hermanos del caso índice, presenten también la infección. Una vez obtenida la confirmación diagnóstica, debería realizarse el seguimiento del caso y su grupo familiar, junto a estrategias educativas eficaces y atención médica oportuna, que incluya eventual terapia específica.

III. HIPÓTESIS

- Mediante el estudio serológico y parasitológico de los hijos de madres chagásicas, es posible detectar casos de transmisión vertical de *T. cruzi* no pesquisados en el parto.
- Gracias a que en Chile se encuentra interrumpida la transmisión vectorial desde 1999 (OPS, 2006) y por medio de las herramientas de estudio parasitológico (PCR; XD) y serológico (IFI; ELISA), es posible inferir la existencia de infección congénita trans-generacional por *T. cruzi* en grupos familiares de la Provincia del Choapa.

IV. OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio trans-generacional de la infección chagásica en grupos familiares maternos de la Provincia del Choapa; mediante evaluación epidemiológica, parasitológica y de la respuesta inmune humoral.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar madres serológicamente positivas para enfermedad de Chagas y conformar grupos familiares que incluyan a sus hijos y a la abuela materna de estos últimos.
- Evaluar a los miembros de estos grupos familiares mediante técnicas serológicas indirectas; la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* y en los casos positivos, realizar estudios parasitológicos.
- Inferir, de acuerdo a los resultados e información obtenida, los posibles mecanismos de transmisión en los casos positivos detectados.
- Establecer si la enfermedad de Chagas constituye un problema de Salud Pública que involucra a grupos familiares y que por tanto, debería ser abordada multidisciplinariamente, evaluando clínica y epidemiológicamente el entorno del caso índice.

VI. MATERIAL, SUJETOS Y MÉTODOS

a. CONFORMACIÓN DE GRUPOS FAMILIARES

El grupo en estudio estuvo conformado por 32 mujeres (con edades que fluctuaron entre 19 y 45 años) que habitan localidades urbanas o rurales de las comunas de Salamanca, Illapel y Canela, en la Provincia del Choapa, IV Región de Chile. En todas estas mujeres se confirmó la infección por *T. cruzi* mediante serología convencional (ELISA e IFI IgG positiva) durante su control de embarazo. El parto ocurrió entre enero del 2005 y julio del 2006. Este grupo familiar incluyó, además, a los hijos de estas madres chagásicas, que para efectos del estudio, fueron subdivididos en dos grupos: hijos menores o iguales a un año e hijos mayores de un año. Se incluyó además, en la conformación de este grupo, a las abuelas maternas de estos niños. El grupo en estudio quedó, de esta manera, conformado por cuatro sub-grupos:

- Madres chagásicas.
- Hijos menores o iguales a un año. Caso Índice (C.I.)
- Hijos mayores de un año. (hermanos de C.I.)
- Abuelas maternas.

El grupo control estuvo conformado de forma similar, pero a partir de 32 mujeres serológicamente negativas para *T. cruzi* (madre, hijos mayores de un año, hijos menores o iguales a un año y abuelas).

b. ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA (*anexo 1*)

Se aplicó una encuesta “*ad hoc*” a las madres chagásicas y a los casos positivos diagnosticados durante este estudio, para obtener datos epidemiológicos (conocimiento y presencia de vinchucas, calidad de la vivienda, etc.) y clínicos (antecedentes de enfermedades cardíacas, abortos, antecedentes de enfermedades familiares, etc.), todos datos relevantes para descartar otros mecanismos de transmisión diferentes al transplacentario.

c. OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

i) **Sangre periférica:** A los individuos en estudio, se les extrajo 10 ml de sangre venosa, sin anticoagulante, con el fin de producir la retracción del coágulo y obtener suero para las reacciones de IFI y ELISA (ésta última realizada en el Laboratorio de Referencia de Parasitología, Instituto de Salud Pública). A los casos serológicamente positivos se les tomó una nueva muestra de sangre para realizar PCR. Se efectuó, a todos los niños nacidos entre enero del 2005 y julio del 2006, las técnicas de IFI, ELISA y PCR, en muestras de sangre obtenidas al nacimiento (el estudio en los niños nacidos durante el 2005 fue de manera retrospectiva, por lo que no tienen muestra al nacimiento), 9 y 12 meses de edad respectivamente.

ii) **Xenodiagnóstico:** Se aplicó en los pacientes con serología positiva para *T. cruzi* (IFI y ELISA), dos cajitas que contenían cada una 7 ninfas de tercer o cuarto estadio de *T. infestans* libres de infección. Luego de su aplicación por 20 a 30 minutos en la cara externa de cada brazo de los pacientes en estudio, las cajas fueron mantenidas a 27°C realizándose un examen microscópico de la muestra fecal de cada insecto a los 30, 60 y 90 días de incubación con el fin de observar las formas tripomastigotes de *T. cruzi*.

d. REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (*Anexo 2*)

Se utilizó como antígeno formas epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahuén (cedidas gentilmente por el Dr. Juan Diego Maya del Programa de Farmacología, ICBM. Facultad de Medicina), las que fueron cultivadas en medio Diamond suplementado con 5% de SFB y mantenidos a 28°C. La cosecha se realizó durante la fase exponencial de crecimiento por centrifugación a 500 G por 10 minutos a 4°C. Se consideró como reacción positiva un título igual o mayor a 1/20. En cada determinación fueron incluidos controles positivos y negativos (Zulantay, *et al.*, 1998). Como conjugado se utilizó Fluoline G (Globulina de cabra anti IgG humana marcada con isocianato de fluoresceína. BioMerieux, Ref. 75692).

Los resultados fueron evaluados además en laboratorio externo (Laboratorio de Referencia de Parasitología del Instituto de Salud Pública de Chile, ISP).

e. REACCIÓN DE ELISA

Se utilizaron como antígeno formas epimastigotes de *T. cruzi* cepa Tulahúen y las placas fueron sensibilizadas con 5 µg de antígeno por pocillo. La determinación de densidad óptica (DO) se realizó en lector automático Dynatech a 490 nm. El límite discriminativo de positividad se calculó como el producto de la media aritmética de los controles negativos más 3 desviaciones estándar (Zulantay, *et al.*, 1998). Este análisis fue efectuado en el Laboratorio de Parasitología ISP.

f. REACCIÓN DE PCR

Se desarrolló de acuerdo a la técnica descrita por Solari *et al.* (2001) y Zulantay *et al.* (2004). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µl de DNA extraído y purificado de sangre periférica de los individuos en estudio, 2 µl de 121 (5'-AAATAATGTACGGG (T/G) GAGATGCATGA3') y 122 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'), estos oligonucleótidos estaban a una concentración de 25 µM, 10 µl de buffer de Taq polimerasa (Tris-HCl pH 8.8 67 mM, 16.6 mM de (NH₄)₂SO₄, 6.7 mM de MgCl₂, 10 mM 2-Mercaptoetanol), 0.5 µl de BSA, 1µl (0.4 mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 29 µl de agua bidestilada para un volumen final de 50 µl, además de 4 U Taq polimerasa (0.5 µl). Esta mezcla fue cubierta por 80 µl de aceite mineral. La reacción de PCR se llevó a cabo con el siguiente programa de amplificación: un ciclo inicial de 98°C por 2 min., otro de 1 min. a la misma temperatura, luego 64°C por 1 min. y finalmente 2 min. a 72°C; 33 ciclos intermediarios de 94°C por 1 min., 64°C por 1 min. y 72°C por 2 min.; y un ciclo final de 72°C por 10 min. La reacción de PCR se realizó en un termociclador PTC-100. Posteriormente, 10 µl del amplificado fueron mezclados con 4 µl de buffer de carga que contenía xilenxianol y azul de bromofenol y se sometió a electroforesis durante 90 min. a 115 volts en gel de agarosa al 2%. El gel fue teñido con bromuro de etidio (10µg/ml) por 10 min. y luego fotografiado.

NOTA: Todos los procedimientos que se realizaron en humanos en el presente estudio, cuentan con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Todos los menores de edad que fueron muestreados para este estudio, cuentan con el Consentimiento Informado de sus padres.

VII. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el Grupo de estudio, con un total de 141 personas, de las cuales 138 fueron evaluadas en los aspectos serológicos, parasitológicos y epidemiológicos; encontrándose que el 71,4% de las abuelas, 3,1% de los niños nacidos en el periodo y 2,2% de los hermanos estudiados fueron serológicamente positivos a la infección con *T. cruzi* (Tablas 1-3).

A. Resultados Grupo de Estudio:

Tabla 1

DISTRIBUCIÓN DE 10 MADRES CHAGÁSICAS PROCEDENTES DE SALAMANCA, PROVINCIA DE CHOAPA, IV REGIÓN, CHILE; SUS HIJOS MENORES O IGUAL A UN AÑO, MAYORES A UN AÑO Y ABUELAS MATERNAS, SEGÚN SEROLOGÍA, XENODIAGNÓSTICO Y PCR PARA ENFERMEDAD DE CHAGAS. (ENERO 2005 A JULIO 2006)

CATEGORIAS	TOTAL	SEROLOGÍAS		PCR		XD	
		n	+	n	+	n	+
Madres Chagásicas	10	10	10	10	7	10	0
Abuelas	10	9	7	7	5	4	1
Caso Índice (≤ a 1 año)	10	10	0	10	0	-	-
Hermanos (>de 1 año)	17	17	0	-	-	-	-

En la Tabla 1, se detallan los resultados serológicos y parasitológicos obtenidos del estudio de 10 madres y los integrantes de su grupo familiar, procedentes de Salamanca. Se pudo observar que:

- En 7 de las 10 madres chagásicas pesquisadas se diagnosticó PCR positivo, pero ninguna de ellas XD positivo.
- Ninguno de los 10 niños nacidos entre enero 2005 y julio 2006 en esta localidad, y que fueron estudiados serológica y parasitológicamente en retrospectiva (al nacimiento y/o a los 9 y 12 meses de edad), resultó infectado congénitamente por *T. cruzi*.

- No se encontró seropositividad a la infección con *T. cruzi* en niños mayores de 1 año (hermanos del caso índice).
- Se pesquisaron 7 abuelas chagásicas crónicas, de las cuales 5 tienen PCR positivo y solo una XD positivo.

Tabla 2

DISTRIBUCIÓN DE 12 MADRES CHAGÁSICAS PROCEDENTES DE ILLAPEL, PROVINCIA DE CHOAPA, IV REGIÓN, CHILE; SUS HIJOS MENORES O IGUAL A UN AÑO, MAYORES A UN AÑO Y ABUELAS MATERNAS, SEGÚN SEROLOGÍA, XENODIAGNÓSTICO Y PCR PARA ENFERMEDAD DE CHAGAS. (ENERO 2005 A JULIO 2006)

CATEGORIAS	TOTAL	SEROLOGÍAS		PCR		XD	
		n	+	n	+	n	+
Madres Chagásicas	12	12	12	12	5	12	0
Abuelas	12	12	7	5	2	4	0
Caso Índice (≤ a 1 año)	12	12	0	12	0	-	-
Hermanos (>de 1 año)	9	9	0	-	-	-	-

En la Tabla 2, se detallan los resultados serológicos y parasitológicos obtenidos en los grupos familiares de 12 madres procedentes de Illapel. Al respecto se pudo observar que:

- 5 de las 12 madres serológicamente positivas presentó PCR positivo y ninguna de ellas resultó con XD positivo.
- No hay casos serológicamente positivo a *T. cruzi* en los 12 niños nacidos en este periodo, ni en sus hermanos.
- Se estudiaron 12 abuelas en esta localidad, encontrándose que 7 de ellas eran portadoras de una enfermedad de Chagas crónica, 2 tenían PCR positivo y ninguna XD positivo.

Tabla 3

DISTRIBUCIÓN DE 10 MADRES CHAGÁSICAS PROCEDENTES DE CANELA, PROVINCIA DE CHOAPA, IV REGIÓN, CHILE; SUS HIJOS MENORES A UN AÑO, MAYORES A UN AÑO Y ABUELAS MATERNAS, SEGÚN SEROLOGÍA, XENODIAGNÓSTICO Y PCR PARA ENFERMEDAD DE CHAGAS (ENERO 2005 A JULIO 2006)

CATEGORÍAS	TOTAL	SEROLOGÍAS		PCR		XD	
		n	+	n	+	n	+
Madres Chagásicas	10	10	10	10	8	10	0
Abuelas	9	7	6	6	1	4	1
Caso Índice (≤ a 1 año)	10	10	1♣	10	1♣	-	-
Hermanos (>de 1 año)	20	20	1♦	1	1♦	-	-

♣ Caso de niño cuya serología y PCR fue positivo en cada una de las muestras seriadas que se realizaron durante este estudio (el resultado incluido en la Tabla corresponde a muestra tomada al año de edad).

♦ Caso de niño de 10 años que presenta serología y PCR positivo. Para este estudio se le realizaron dos muestreos. La serología fue confirmada por ISP

En la Tabla 3, se detallan los resultados serológicos y parasitológicos obtenidos en 10 madres y sus grupos familiares procedentes de Canela. Se observó lo siguiente:

- El 8 de estas madres chagásicas presentó PCR (+), todas con resultados negativos de XD.
- En esta localidad un caso índice resultó positivo tanto serológica como parasitológicamente (PCR) a la infección con *T. cruzi*. Ambos resultados se mantuvieron a los 9 y 12 meses. Este caso se encuentra actualmente en tratamiento.
- Fue encontrado un niño de ocho años serológicamente positivo y cuyo PCR también es positivo. Este niño es hermano de un caso índice serológicamente negativo.

- En este grupo de 9 abuelas maternas, encontramos 6 que eran chagásicas y de ellas solo una presenta resultados parasitológicos positivos para *T. cruzi* (PCR y XD).

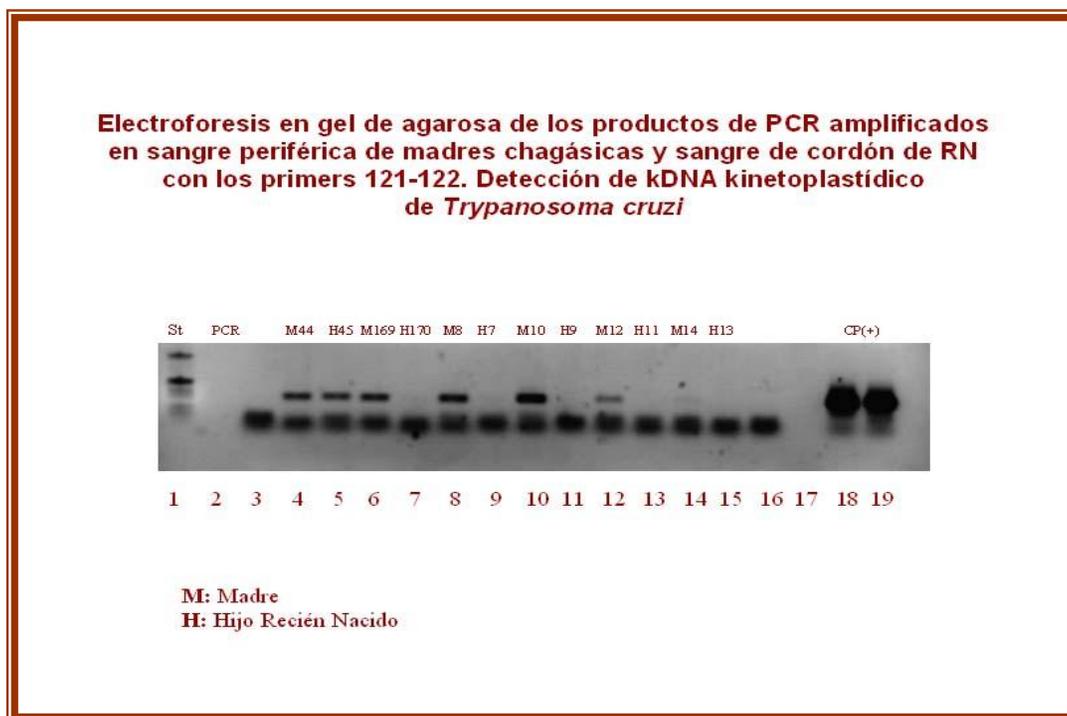


Figura 3

B. Resultados Grupo Control:

A continuación (Tablas 4-6), se presentan los resultados obtenidos en el grupo control conformado por 32 mujeres serológicamente negativas y sus grupos familiares (casos índice, hijos mayores o iguales a un año y las abuelas maternas de estos niños), con un total de 107 personas de las cuales 105 fueron evaluadas en los aspectos serológicos, parasitológicos y epidemiológicos, en ellos pesquisamos a 30,4% abuelas positivas a la infección por *T. cruzi*, no encontrándose ni C.I., ni hermanos positivos.

Tabla 4

DISTRIBUCIÓN DE 9 MADRES CONTROL PROCEDENTES DE SALAMANCA, PROVINCIA DE CHOAPA, IV REGIÓN, CHILE; SUS HIJOS MENORES A UN AÑO, MAYORES A UN AÑO Y ABUELAS MATERNAS, SEGÚN SEROLOGÍA, XENODIAGNÓSTICO Y PCR PARA ENFERMEDAD DE CHAGAS. (ENERO 2005 A JULIO 2006)

CATEGORIAS	TOTAL	SEROLOGÍAS		PCR		XD	
		n	+	n	+	n	+
Madres Control	9	9	0	9	0	-	-
Abuelas	9	7	4	7	2	-	-
Caso Índice (≤ a 1 año)	9	9	0	9	0	-	-
Hermanos (>de 1 año)	8	8	0	-	-	-	-

En la Tabla 4, se detallan los resultados serológicos y parasitológicos obtenidos en 9 madres y cuyos integrantes del grupo familiar, proceden de Salamanca. Al respecto se pudo observar que:

- Ninguna de las 9 madres estudiadas fue ni serológica, ni parasitológicamente positiva a la infección con *T. cruzi*. (IFI y PCR negativos).
- Los 9 niños estudiados y que nacieron en este periodo son seronegativos a *T. cruzi*. (a los 12 meses de edad).
- Los 8 niños mayores o iguales a un año y que provienen de estos 9 grupos familiares, resultaron ser negativos a la infección con *T. cruzi*.
- Se estudiaron 7 abuelas de las 9 que conformaban este grupo; 4 eran chagásicas crónicas, 4 con PCR (+).

Tabla 5

DISTRIBUCIÓN DE 14 MADRES CONTROL PROCEDENTES DE ILLAPEL, PROVINCIA DE CHOAPA, IV REGIÓN, CHILE; SUS HIJOS MENORES A UN AÑO, MAYORES A UN AÑO Y ABUELAS MATERNAS, SEGÚN SEROLOGÍA, XENODIAGNÓSTICO Y PCR PARA ENFERMEDAD DE CHAGAS. (ENERO 2005 A JULIO 2006)

CATEGORIAS	TOTAL	SEROLOGÍAS		PCR		XD	
		n	+	n	+	n	+
Madres Control	14	14	0	14	0	14	0
Abuelas	7	7	3	7	0	1	0
Caso Índice (≤ a 1 año)	15	15	0	15	0	-	-
Hermanos (>de 1 año)	9	9	0	-	-	-	-

En la Tabla 5, se detallan los resultados serológicos y parasitológicos obtenidos en 14 madres con sus grupos familiares y cuyos integrantes proceden de Illapel. Al respecto se pudo observar que:

- Las 14 madres estudiadas fueron negativas a la infección con *T. cruzi*.
- Los 15 C.I. estudiados (ya que hay una pareja de mellizos), son negativos a la infección con *T. cruzi*.
- Los 9 niños >1 año estudiados (hermanos del C.I.) fueron serológicamente negativos.
- De las 7 abuelas estudiadas 3 de ellas son chagásicas, con un PCR (-).

Tabla 6

DISTRIBUCIÓN DE 9 MADRES CONTROL PROCEDENTES DE CANELA, PROVINCIA DE CHOAPA, IV REGIÓN, CHILE; SUS HIJOS MENORES A UN AÑO, MAYORES A UN AÑO Y ABUELAS MATERNAS, SEGÚN SEROLOGÍA, XENODIAGNÓSTICO Y PCR PARA ENFERMEDAD DE CHAGAS. (ENERO 2005 A JULIO 2006)

CATEGORIAS	TOTAL	SEROLOGÍAS		PCR		XD	
		n	+	n	+	n	+
Madres Control	9	9	0	9	0	9	0
Abuelas	9	9	1	9	0	-	-
Caso Índice (≤ a 1 año)	9	9	0	9	0	-	-
Hermanos (>de 1 año)	0	-	-	-	-	-	-

En la Tabla 6, se detallan los resultados serológicos y parasitológicos obtenidos en 9 madres control y cuyos integrantes del grupo familiar, proceden de Canela. Al respecto se pudo observar que:

- Las 9 madres resultaron serológica y parasitológicamente negativas (IFI y PCR negativos).
- Todos los niños nacidos en este periodo (9 C.I.) resultaron negativos a la infección con *T. cruzi*.
- En Canela ningún hermano de CI fue estudiado, entre las razones de este hecho se encuentran:
 - La ruralidad que impidió, en algunos casos, acudir a la citación
 - La falta de educación de las madres con respecto a las implicancias que la enfermedad de Chagas tiene en los individuos infectados.
 - La mayoría de los CI aquí estudiados corresponden a parto primerizo.
- De las 9 abuelas estudiadas, solo una resultó chagásica, pero su PCR resultó negativo

Al analizar los resultados globales obtenidos en este estudio y cuya muestra corresponde a 32 familias del grupo estudio y 32 familias del grupo control observamos que:

- Un 62,5% de las madres chagásicas (grupo estudio) presentó un PCR positivo, en ninguna de ellas obtuvimos un XD positivo. En cuanto a las abuelas de estos grupos familiares, pesquisamos 20 casos (de 28 en total) serológicamente positivas (71,4%), 8 abuelas se encontró PCR positivo. Solo 2 abuelas del grupo estudio tenían XD positivo. Se encontraron 2 casos de niños serológicamente positivos; uno corresponde a un niño nacido en el periodo (C.I.) y el otro, a uno de los 46 hijos >1 año (hermano C.I.). Ambos niños poseen madre y abuela con serología positiva para *T. cruzi* y entre ellos no existe parentesco alguno. Además, sus madres poseen PCR positivo.
- En el grupo control, todas las madres resultaron negativas a la infección con *T. cruzi* tanto serológica (IFI y ELISA) como parasitológicamente (PCR). No encontramos casos serológicamente positivos en los hijos de las categorías \leq a 1 año (C.I.), ni en $>$ de 1 año (hermanos C.I.). En cuanto a las abuelas de estos grupos familiares, pesquisamos 7 casos (de un total de 23 abuelas) con serología positiva para *T. cruzi* (30,4%), 2 abuelas tenían PCR positivo.

C. Resultados encuesta epidemiológica:

1) Encuesta epidemiológica en madres chagásicas:

Se encuestó según instrumento *ad hoc* preparado para este estudio (adjunto en Anexo), a las 32 madres chagásicas del grupo de estudio, con el fin de obtener información epidemiológica que permitiera conocer factores relacionados con los mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas (vectorial y transfusional), al interior de estos grupos familiares. Los antecedentes recogidos más relevantes son:

- i) ***Habitación actual:*** El material más comúnmente utilizado para la construcción de las viviendas que habitan en la actualidad estas familias, corresponde en un 40,63% a madera, seguido por la vivienda de tipo mejora (ladrillo y techo de zinc) con un 37,5% y adobe con un 21,88%. Se destaca además, que en la

localidad de Canela, un 30% de las familias aún habita en vivienda de adobe. La techumbre más utilizada en estos domicilios es el zinc (81,35%).

- ii) **Habitación Pasada:** En contraste con lo anterior, la vivienda anterior más común fue el adobe (71,88%). Sólo el 3,13% señaló haber habitado una vivienda tipo mejora en el pasado. Y en cuanto a las techumbres, aparecen otros materiales como lo son la fonolita, maciza (aglomerado) y el coirón.
- iii) **Presencia de animales:** El 65,63% de las familias posee animales domésticos. Se destaca de entre ellos la masiva presencia de la especie canina en estos hogares con un 95,24%. Las aves de corral (gallinas y pollos) le siguen al perro en representación. En la localidad de Canela y Salamanca hay mayor presencia de otras especies animales como lo son: caprinos, ovinos, asnos y equinos. Llama la atención la presencia de un espécimen exótico (hámster) en una de las viviendas de Illapel.
- iv) **Conocimiento de la vinchuca:** El 62,5% de las madres encuestadas señala conocer a la vinchuca, la mayoría de estas mujeres (32,5%) la conoció durante la niñez, el 18,81% la conoció a través de folletos educativos o en insectarios de propiedad de los hospitales o postas de la zona en la que habitan. El 6% restante no recuerda donde la conoció.
- v) **Transmisión vectorial:** El 50% de las encuestadas señaló tener conciencia de haber sido picada por la vinchuca, mientras que el 37,5% no lo sabe y el 12,5% asegura no haber sido picada.
- vi) **Presencia de vinchucas en los domicilios:** Solo en 9,38% de los domicilios actuales existe vinchucas y este valor corresponde a tres domicilios (uno en Salamanca y dos en Canela). En contraste con lo anterior, al consultar a las madres si en domicilios anteriores habían vinchucas, el 59,38% señaló que sí. En uno de los domicilios visitados en Salamanca conservaban un espécimen de *T. infestans*. Un niño de la localidad de Illapel (primo del C.I.) fue picado por un espécimen de *M. spinolai* en el antejardín de su casa.
- vii) **Desinfección domiciliaria:** El 56,25% de las madres chagásicas desinfecta regularmente su domicilio, procedimiento realizado de forma personal y no a través del Departamento de Salud del Ambiente, por lo que los productos que utilizan no son los más adecuados (Superkill, Raid, etc.). Al preguntarles la

frecuencia en que realizan la desinsectación, el 77,7% lo hace al menos una vez al año.

- viii) **Familiares con enfermedad de Chagas:** El 40,63% de las madres chagásicas tiene al menos un hermano positivo a la enfermedad y el 12,5% tiene un pariente chagásico distinto a su núcleo familiar (tío, primo, etc.). El 46,87% restante señala desconocer si tiene algún pariente chagásico.
- ix) **Transfusiones sanguíneas:** Solo 3 de las madres encuestadas han recibido transfusiones (9,38%).
- x) **Actividad laboral:** Tres de estas madres señala tener un trabajo fuera del hogar. Una de ellas es Educadora Diferencial, la otra es administrativa en el Consultorio de Canela y la tercera es Ingeniero Agrónomo.

2) **Encuesta epidemiológica en abuelas chagásicas:**

Se aplicó la encuesta epidemiológica en 6 de las 20 abuelas pesquisadas como positivas en el grupo estudio, esto debido a que una vez diagnosticadas como positivas, las pacientes no acudieron a los controles programados por nuestro equipo de trabajo; además en muchos casos la toma de muestra de sangre periférica, necesaria para confirmar la serología y PCR, fue realizada por personal de los servicios de salud de la zona que colaboraron en el estudio, los cuales no pudieron aplicar dicha encuesta, por razones de tiempo y dificultad operatoria.

Los resultados que dieron las encuestas en las abuelas positivas fueron los siguientes:

- i) **Calidad de la vivienda:** 4 de ellas vive en la actualidad en viviendas de adobe, 1 en casa de madera y 1 en vivienda mejorada de bloques de cemento. 4 de estas viviendas tiene techo de zinc y 2 de pizarreño. Todas estas abuelas vivían en casas de adobe con techo de zinc en el pasado.
- ii) **Presencia de animales:** 3 abuelas señalan no poseer animales en sus viviendas. Las restantes tienen diferentes especies: equinos, ovinos, caprinos, asnos, aves de corral y caninos, esta última especie se encuentra presente en estos 3 domicilios. En 2 de estas viviendas hay corrales para los animales, construidos a base de adobe, piedras y ramas.

- iii) **Conocimiento de la vinchuca:** Solo 1 de estas 6 abuelas señala no conocer a la vinchuca, el resto la conoció en sectores rurales de la zona (Ej: Quebrada de Linares). Todas señalan que en la actualidad sus viviendas están libres del vector, 5 indican que en domicilios anteriores tenían vinchucas. Al preguntarles si creían haber sido picadas todas respondieron afirmativamente. 3 abuelas nunca han desinsectado sus viviendas y las restantes han solicitado fumigaciones del Servicios de Salud del Ambiente de Illapel.
- iv) Las 6 abuelas señalaron que al menos uno de sus hijos tiene la enfermedad de Chagas. Una sola había recibido transfusión sanguínea y una de ellas trabaja fuera del hogar como transportista.

3) **Encuesta epidemiológica en madres negativas a la infección con T. cruzi (Grupo control):**

Aunque no era un objetivo inicial para este estudio, aplicamos la encuesta epidemiológica a 16 madres del grupo control negativo (de un total de 32 madres), los resultados obtenidos son los siguientes:

- i) **Calidad de vivienda:** La mayoría de estas mujeres habita en la actualidad en viviendas de ladrillo (9 viviendas), 4 en casas de madera y 3 en vivienda de adobe. 14 de estas viviendas tiene techo de zinc y 2 de pizarreño. En el pasado la vivienda más representativa en este grupo de 16 mujeres era de madera (12 viviendas), luego ladrillo (3 viviendas) y una de adobe.
- ii) **Presencia de animales:** 10 de estas madres señaló poseer animales en sus domicilios. Las especies eran: caninos, aves de corral (gallinas, pollos y patos), felinos; en 9 de estos domicilios había a lo menos un perro. Estos animales viven en el exterior de las viviendas en instalaciones de malla y madera.
- iii) **Conocimiento de la vinchuca:** la mayoría de estas madres (10 en total) conocían las vinchucas, ya sea silvestre (“la roja” le llamaban) y la domestica (“la amarilla”). 4 de ellas las conocieron en lugares que frecuentaban durante la niñez (Ej.: sector de Camisa y Zapallar en Salamanca), las 6 restante las conocieron por campañas educativas, en los insectarios del hospital y a través de fotos e ilustraciones en las escuelas a las que asistían. Solo una madre señaló

tener recuerdo de haber sido picada por vinchucas. Ninguna de estas 16 madres tiene en la actualidad el insecto en sus hogares, 5 de las cuales habían tenido, en el pasado, triatominos en sus domicilios. Sólo en 7 viviendas se ha realizado desinsectación de manera particular, la última durante el 2006.

- iv) 7 de estas 16 madres tiene a lo menos un familiar con la enfermedad de Chagas. Llama la atención que 4 de estas 7 mujeres, desconocía la condición de chagásica de su propia madre. 2 de estas mujeres ha recibido transfusión sanguínea y 2 trabajan fuera del hogar (contadora y paramédico).

D. Resultados del Estudio Clínico:

Se pesquisaron 52 mujeres positivas a la infección con *T. cruzi* (madres o abuelas), en 42 de ellas (29 madres y 13 abuelas), se aplicó ECG. En 20 madres y 10 abuelas de este grupo se observaron alteraciones electrocardiográficas, algunas de las cuales implican, necesariamente, la implantación de marcapaso.

VIII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados aplicando las pruebas de diferencias de tasas de infección congénita entre el grupo control y grupo de estudio, pruebas de asociación y de homogeneidad, considerando un error máximo de un 5%.

Para determinar si existen diferencias significativas entre las frecuencias observadas y las esperadas para la variable serología (IFI y ELISA), PCR y XD se utilizó el estadístico Chi-cuadrado (χ^2):

$$\chi^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

La hipótesis nula para esta prueba será aceptada cuando χ^2 sea menor o igual al valor determinado en la tabla de distribución para la prueba con un error de 5%.

Las hipótesis a comprobar son:

$$\chi^2 \leq \left\{ \begin{array}{l} H_0: \text{No existen diferencias significativas entre los porcentajes de positividad} \\ \text{chagásica de las abuelas, hijos } \leq 1 \text{ año (Caso índice) e hijos } > 1 \text{ año} \\ \text{(hermanos) entre los grupos de madres chagásicas (grupo de estudio) y} \\ \text{madres no chagásicas (grupo control)} \\ H_1: \text{Existen diferencias significativas entre los porcentajes de positividad} \\ \text{chagásica de las abuelas, hijos } \leq 1 \text{ año (Caso índice) e hijos } > 1 \text{ año} \\ \text{(hermanos) entre los grupos de madres chagásicas (grupo de estudio) y} \\ \text{madres no chagásicas (grupo control)} \end{array} \right.$$

En casos en que las frecuencias observadas no sean lo suficientemente grandes para utilizar la prueba de χ^2 , utilizaremos el estadístico exacto de Fisher cuyo valor debe ser $\geq 0,05$ para aceptar que no existen diferencias estadísticamente significativas (H_0).

ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Debido a que los grupos familiares fueron conformados en torno a las madres; para el análisis estadístico llamaremos “Madre Serología negativo” al grupo control y “Madre Serología positivo” al grupo de estudio.

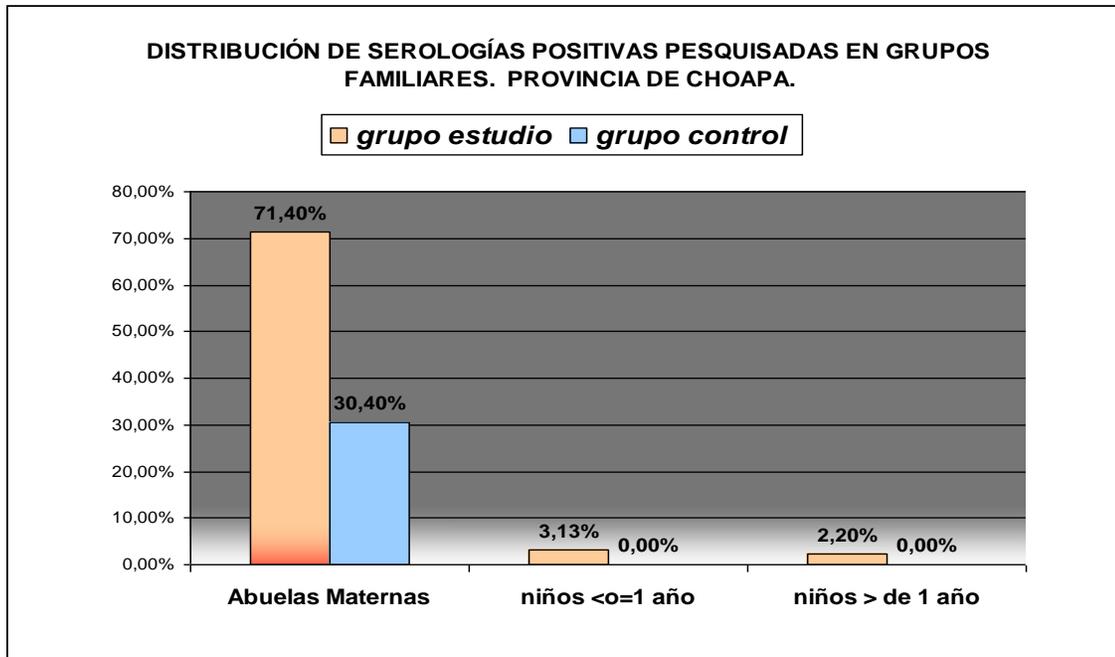


Figura 4

A) ANÁLISIS ENTRE LAS ABUELAS DE LOS GRUPOS:

Tabla 7
TABLA DE CONTINGENCIA
Madre Serología * Abuela Serología

			Abuela Serología		Total
			negativo	positivo	
Madre Serología	negativo	Recuento	16	7	23
		% de Madre Serología	69,6%	30,4%	100,0%
	positivo	Recuento	8	20	28
		% de Madre Serología	28,6%	71,4%	100,0%
Total	Recuento		24	27	51
	% de Madre Serología		47,1%	52,9%	100,0%

En el grupo control (madres serológicamente negativa), el 30,4% de las abuelas son serológicamente positivas, en cambio en el grupo de estudio (madres serológicamente positiva) el 71,4% son abuelas serológicamente positivas, esta diferencia es estadísticamente significativa ($\chi^2 = 8,518$; $p = 0,005$), lo que significa que existe asociación entre las serologías de la madre y la abuela.

Tabla 8
TABLA DE CONTINGENCIA
Madre Serología * Abuela PCR

			Abuela PCR		Total
			negativo	positivo	
Madre Serología	negativo	Recuento	20	2	22
		% de Madre Serología	90,9%	9,1%	100,0%
	positivo	Recuento	16	8	24
		% de Madre Serología	66,7%	33,3%	100,0%
Total		Recuento	36	10	46
		% de Madre Serología	78,3%	21,7%	100,0%

En el grupo control (madres serológicamente negativas), el 9,1% de las abuelas tienen PCR positivo, en cambio en el grupo de estudio (madres serológicamente positivas) el 33,3% tienen PCR positivo, esta diferencia es estadísticamente significativa ($\chi^2 = 3,965$; $p = 0,074$), por lo que existe asociación entre la serología de la madre y el PCR de la abuela.

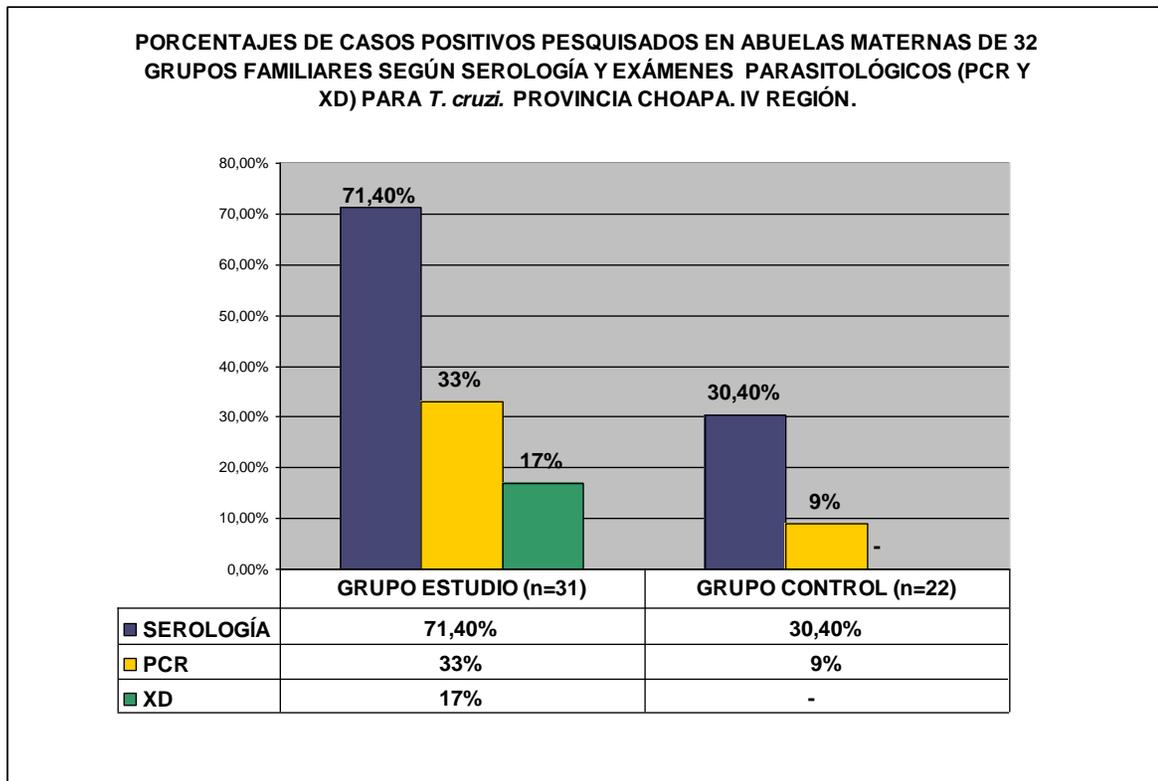


Figura 5

B) ANÁLISIS ENTRE LOS CASOS ÍNDICE DE LOS GRUPOS:

Tabla 9
TABLA DE CONTINGENCIA
Madre Serología * Caso Índice Serología

			Caso Índice Serología		Total
			negativo	positivo	
Madre Serología	negativo	Recuento	33	0	33
		% de Madre Serología	100,0%	0%	100,0%
	positivo	Recuento	31	1	32
		% de Madre Serología	96,9%	3,1%	100,0%
Total		Recuento	64	1	65
		% de Madre Serología	98,5%	1,5%	100,0%

En el grupo control (madres serológicamente negativas), el 0% de los hijos ≤ 1 año tienen serología positiva, en cambio en el grupo de estudio (madres serológicamente positivas) el 3,1% tiene serología positiva, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($\chi^2 = 1,047$ $p = 0,492$), lo que significa que no existe asociación entre la serología de la madre y la de su hijo recién nacido (C.I.).

Tabla 10
TABLA DE CONTINGENCIA
Madre Serología * Caso Índice PCR

			Caso Índice PCR		Total
			negativo	positivo	negativo
Madre Serología	negativo	Recuento	33	0	33
		% de Madre Serología	100,0%	0%	100,0%
	positivo	Recuento	31	1	32
		% de Madre Serología	96,9%	3,1%	100,0%
Total		Recuento	64	1	65
		% de Madre Serología	98,5%	1,5%	100,0%

En el grupo control (madres serológicamente negativas), el 0% de los hijos ≤ 1 año tiene PCR positivo, en cambio en el grupo de estudio (madres serológicamente positivas) el 3,1% tiene PCR positivo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($\chi^2 = 1,047$ $p = 0,492$), lo que significa que no existe asociación entre la serología de la madre con la de su hijo recién nacido (C.I.).

C) Análisis entre hermanos de los grupos:

Tabla 11
TABLA DE CONTINGENCIA
Madre Serología * Hermano Serología

			Hermano Serología		Total
			negativo	positivo	
Madre Serología	negativo	Recuento	17	0	17
		% de Madre Serología	100,0%	0%	100,0%
	positivo	Recuento	45	1	46
		% de Madre Serología	97,8%	2,2%	100,0%
Total		Recuento	62	1	63
		% de Madre Serología	98,4%	1,6%	100,0%

En el grupo control, el 0% de los hijos >1 año tiene serología positiva, en cambio en el grupo de estudio (madres serológicamente positivas) el 2,2% tiene serología positiva, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($\chi^2 = 0,423$ $p = 0,710$), lo que significa que no existe asociación entre la serología de la madre con la de su hijo > 1 año (hermano C.I.).

D) Análisis entre localidades:

Tabla 12
TABLA DE CONTINGENCIA
Madre Serología * Localidad

			Localidad			Total
			Salamanca	Illapel	Canela	
Madre Serología	negativo	Recuento	9	14	9	32
		% de Madre Serología	28,1%	43,8%	28,1%	100,0%
	positivo	Recuento	10	12	10	32
		% de Madre Serología	31,3%	37,5%	31,3%	100,0%
Total		Recuento	19	26	19	64
		% de Madre Serología	29,7%	40,6%	29,7%	100,0%

El análisis estadístico por localidad nos indica que no existen diferencias significativas entre localidades para la serología de las madres, es decir, la serología de las madres no se encuentra asociada a la localidad. El valor para la prueba de χ^2 es de 0,259, $p = 0,903$.

Tabla 13
TABLA DE CONTINGENCIA
Caso Índice Serología * Localidad

			Localidad			Total
			Salamanca	Illapel	Canela	
Caso Índice Serología	negativo	Recuento	19	27	18	64
		% de Caso Índice Serología	29,7%	42,2%	28,1%	100,0%
	positivo	Recuento	0	0	1	1
		% de Caso Índice Serología	,0%	,0%	100,0%	100,0%
Total		Recuento	19	27	19	65
		% de Caso Índice Serología	29,2%	41,5%	29,2%	100,0%

El análisis estadístico por localidad nos indica que la serología de los niños ≤ 1 año (C.I.) no se encuentra asociada a la localidad; no existen diferencias significativas. ($\chi^2 = 2,459$; Fisher = 0,585).

Tabla 14
TABLA DE CONTINGENCIA
Abuela Serologia * Localidad

			Localidad			Total
			Salamanca	Illapel	Canela	
Abuela Serología	negativo	Recuento	6	9	9	24
		% de Abuela Serologia	25,0%	37,5%	37,5%	100,0%
	positivo	Recuento	10	10	7	27
		% de Abuela Serologia	37,0%	37,0%	25,9%	100,0%
Total		Recuento	16	19	16	51
		% de Abuela Serologia	31,4%	37,3%	31,4%	100,0%

Al analizar, según la localidad, los resultados de la serología tomada a las abuelas de estos grupos familiares, pudimos apreciar que no existen diferencias significativas ($\chi^2 = 1,130$; Fisher = 0,605).

Tabla 15
TABLA DE CONTINGENCIA
Hermano Serología * Localidad

			Localidad			Total
			Salamanca	Illapel	Canela	
Hermano Serología	negativo	Recuento	25	18	19	62
		% de Hermano Serología	40,3%	29,0%	30,6%	100,0%
	positivo	Recuento	0	0	1	1
		% de Hermano Serología	,0%	,0%	100,0%	100,0%
Total	Recuento		25	18	20	63
	% de Hermano Serología		39,7%	28,6%	31,7%	100,0%

Tampoco se encontraron diferencias significativas entre localidades según la serología tomada a los hijos > 1 año (hermanos C.I.) de estos grupos familiares. ($\chi^2 = 2,185$; Fisher = 0,603).

IX. DISCUSIÓN

El objetivo de esta memoria de título fue realizar un estudio trans-generacional de la infección chagásica en grupos familiares maternos de la Provincia del Choapa; mediante evaluación epidemiológica, parasitológica y de la respuesta inmune humoral.

El grupo de estudio estuvo conformado por 32 madres chagásicas, 32 hijos nacidos entre enero del año 2005 a junio del 2006 (caso índice, C.I.), 46 niños mayores de un año (hermanos de C.I.) y 28 abuelas maternas, con un total de 138 personas evaluadas.

En el grupo control se evaluaron 32 madres seronegativas para *T. cruzi*, 33 C.I. nacidos en el período del estudio (ene. 2005- jul.2006), 17 hermanos de C.I. y 23 abuelas maternas, con un total de 105 personas.

Las 32 madres infectadas con *T. cruzi* detectadas durante este estudio y las 32 madres del grupo control negativo representan parte del universo de mujeres en edad fértil procedentes de las localidades de Canela, Salamanca, Illapel y Los Vilos, Provincia de Choapa.

En relación a la prevalencia de la infección chagásica en mujeres embarazadas en Latinoamérica, se han informado cifras que van desde el 1% a 18%, dependiendo del método diagnóstico empleado y de los factores epidemiológicos involucrados (Schenone *et al.*, 1989). En Chile, se han informado datos similares, en diversos estudios. Por ejemplo, en Salamanca, IV Región, zona de alta endemia chagásica, se determinó la frecuencia de infección por *T. cruzi* en 353 embarazadas, obteniéndose un total de 33,1% mujeres infectadas (Lorca *et al.*, 1987). Estudios posteriores llevados a cabo en la misma Región (Monte Patria, zona de alta endemia) y V Región de Chile (San Felipe, zona de baja endemia), determinaron que la prevalencia de la infección materna era de 7,8% en zona de alta endemia y de 1,4% en la de baja endemia (García *et al.*, 2001). En la Provincia de Choapa, nuestros estudios permiten estimar para el período 2005-2007, una prevalencia actual estimada para las mujeres en edad fértil que proceden de zonas rurales y urbanas del 4,9% (Godoy *et al.*, 2008). Gracias a la eficacia del control del vector, las cifras de prevalencia de infección chagásica en la región, evidencian una disminución, a pesar de ello, la transmisión vertical persistirá como un problema de salud pública, al menos durante los próximos 30 años (Schofield *et al.*, 2006).

En cuanto a la parasitemia de las 32 madres chagásicas, 20 de ellas (62.5%) presentó PCR positivo, es decir, se detectó al parásito circulante; 14 de estas madres (43,7%) tuvieron su C.I. el año 2005 y en cuyo caso la pesquisa fue prospectiva (posterior al parto); en las 6 madres restantes (18,8%), la detección del parásito ocurrió en condiciones de pre-parto durante el año 2006. En relación a la parasitemia materna y su relación con la infección congénita, se ha podido observar en estudios experimentales realizados en ratones, que los efectos de *T. cruzi* sobre el embarazo y su desenlace, dependerían de la carga parasitaria materna, pudiendo llegar a inducir efectos severos y dañinos en la gestación (Mjihdi *et al*, 2002; Id Boufker *et al*, 2006). Al respecto, Hermann *et al.*, (2006) han observado que la transmisión congénita por *T. cruzi* está asociada con altos niveles de parasitemia y respuesta inmunológica deficiente de las madres.

Un aspecto de interés en este estudio, lo constituyen los resultados obtenidos en las abuelas maternas de C.I., del grupo estudio, quienes presentan una alta prevalencia de infección chagásica (71.4%), en relación al grupo control (31.4%). Llama la atención es que las edades de las abuelas maternas de este grupo son mayores que las del grupo control (41 a 75 años v/s 35 a 67 años, respectivamente), factor que podría incidir en el nivel socioeconómico y cultural de estas abuelas fuera menor. Esto es otra muestra más de la eficacia que han tenido en las últimas décadas, los programas de control del vector triatomino en la zona, certificado en Chile por la OMS (WHO, 1999) y que ha permitido disminuir la prevalencia de enfermedad de Chagas en población general.

Cabe entonces hacerse la pregunta: ¿Cómo fue que las mujeres detectadas positivas en este estudio adquirieron la infección por *T. cruzi*? Es probable que haya sido principalmente a través del mecanismo vectorial. Este hecho se fundamenta en los antecedentes epidemiológicos obtenidos de las madres chagásicas del grupo de estudio a través de la encuesta diseñada *ad hoc*, los cuales muestran que el 72% de las madres chagásicas vivió en casa de adobe durante su niñez, el 62.5% conoce la vinchuca y el 50% asegura haber sido picada por ellas. La encuesta epidemiológica de 6 abuelas revela que todas ellas vivieron en vivienda de adobe en el pasado y confirmaron la presencia de vinchucas en estos domicilios. Sólo una de las abuelas encuestadas señala no conocer al insecto vector.

En relación a la parasitemia, fue posible realizar PCR a 18 abuelas del grupo de estudio y a 23 abuelas del grupo control, con una positividad del 28,5% y del 8,7%, para

ambos grupos, respectivamente. El XD fue una herramienta ineficaz para evaluar este parámetro. Al respecto, se confirma una vez más, la mayor sensibilidad de la técnica de PCR para detectar a *T. cruzi* (Zulantay *et al*, 2007). Debemos considerar, que las abuelas están cursando la fase crónica de la enfermedad de Chagas, la cual evoluciona con parasitemias bajas y fluctuantes (Schenone, 1999), difíciles de detectar con métodos parasitológicos convencionales. El análisis estadístico determinó que existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos en ambos grupos, lo que significa que existe asociación entre la serología de la madre con la serología y el PCR de las abuelas. No obstante este análisis, debemos considerar que hace décadas atrás, los niveles de infestación triatomínica en los domicilios era superiores a las cifras actuales y por tanto, no se puede descartar que la transmisión a las abuelas y madres chagásicas haya sido a través del mecanismo vectorial.

En relación a la transmisión vertical de *T. cruzi*, evaluada en el presente estudio, consideramos caso índice (C.I.), a todo hijo de madre chagásica y cuyo parto ocurrió durante el período de estudio (enero 2005 y julio 2006). Se evaluaron un total de 32 niños menores de un año, mediante controles de seguimiento hasta los 12 meses de edad. El 96,9% de los hijos de madres chagásicas, que inicialmente presentaron serología positiva a la infección por *T. cruzi*, negativizaron sus resultados como promedio a los 9 meses de vida, comprobándose solo un caso serológica y parasitológicamente positivo para *T. cruzi*; este caso del recién nacido congénito representa una incidencia total de transmisión vertical de 3,1%. Los antecedentes epidemiológicos de la madre de este niño, muestran que siempre habitó viviendas de concreto en el sector urbano de Canela frecuentando el campo durante la niñez, donde señala haber conocido a la vinchuca. Además, durante el estudio, siempre evidenció parasitemia circulante detectada mediante PCR. En el domicilio actual no se han observado triatominos y no posee animales. La abuela materna también es serológicamente positiva a la enfermedad de Chagas. A la luz de estos antecedentes, podríamos confirmar un caso de transmisión vertical de *T. cruzi*

Estudios realizados en Chile, han establecido que la transmisión congénita urbana y rural varía entre el 6,3% y 8,9%, respectivamente (Schenone *et al*, 1989). Por otra parte, otro estudio en recién nacidos de madres chagásicas efectuado en Salamanca, se descartó esa posibilidad en el 95,6% de los casos por progresiva negativización serológica. En 5 niños se demostró la infección por *T. cruzi* entre los 6 y 12 meses de edad, pero no se logró

establecer en ellos el origen congénito de la infección. La proporción de casos negativos en relación a las madres positivas observadas en Salamanca (95,6%) es similar a la demostrada en otras áreas endémicas de la misma zona, como Vicuña (95,4%) y Ovalle (96,6%) (Lorca *et al.*, 1987). Muñoz, obtiene cifras de 2,1% y 10%, en zonas de alta y baja endemia, respectivamente (1990). Trabajos posteriores realizados el año 2001 en la misma Región (Monte Patria y San Felipe) evidenciaron que la transmisión transplacentaria detectada por PCR alcanzó a 13,7% en zona de alta endemia y 28,2%, en zona de baja endemia (García *et al.*, 2001), la más alta encontrada hasta ahora. Se confirmó posteriormente que en este estudio existió una falla metodológica (se consideró como caso congénito a todos los RN con PCR positivo al nacer). En cuanto a Latinoamérica, la tasa de transmisión de infección congénita por *T. cruzi* varía entre el 1% y el 12% (Carlier y Torrico, 2003), entre cuyos valores se encuentra la cifra obtenida en el presente estudio.

Un aspecto de especial importancia en grupos familiares de zonas de baja y alta endemia chagásica, es la pesquisa de niños menores de 10 años infectados por *T. cruzi* no estudiados al parto y que se encuentran en fase crónica reciente de la enfermedad de Chagas (hermanos de C.I.), ya que se ha sugerido que el diagnóstico precoz de la infección es fundamental para su tratamiento oportuno y eficaz (Luquetti *et al.*, 2005, Lorca *et al.*, 2001). En el grupo de estudio, se evaluaron 46 niños mayores de un año mediante serología convencional (IFI y ELISA IgG). Sólo un niño, de 10 años de edad, procedente de Los Vilos (parto en el Hospital de Illapel), fue positivo (2.17% en hermanos de C.I.). Actualmente se encuentra en control y mantiene después de 12 meses tratamiento, la serología positiva. En cuanto a los antecedentes epidemiológicos de este caso, la madre no conoce a los insectos triatominos silvestre y domésticos, no se han encontrado en los domicilios pasado y actual, no ha recibido transfusiones de sangre, ni trabaja fuera del hogar. La abuela de este niño también es chagásica, pero sus hermanos no lo son. Por el contrario, el niño relata conocer a la vinchuca y haber jugado con ella en el “campo”. Con estos antecedentes, no es posible descartar en este caso el mecanismo vectorial de la enfermedad de Chagas.

Estudios relacionados efectuados en Salta-Argentina, zona de alta endemia chagásica, reveló que la prevalencia de infección chagásica para hermanos de C.I. infectados, era del 31.4%, contrario a los resultados de nuestro estudio (2.17%). Otro hallazgo del mismo estudio evidencia que en 14 familias evaluadas, había más de un niño infectado (Sánchez *et*

al., 2005). Al respecto, se ha observado en Argentina que la prevalencia de mujeres infectadas con *T. cruzi* varía de acuerdo a la región geográfica y a las características socioeconómicas de los grupos estudiados, cifras que se sitúan entre el 4% y 52% (Contreras *et al.*, 1999), pudiendo estar relacionadas estas cifras con insuficientes medidas de control anti-triatomínicas o poco efectivas en la región noreste de Argentina, y dentro de ella, la Provincia de Salta, zona con demostración pendiente de la interrupción de la transmisión vectorial y que presenta focos de transmisión vectorial (Cecere *et al.*, 2006).

Es importante señalar, además, que la encuesta epidemiológica preparada para este estudio, fue aplicada a las madres del grupo control. Si bien ellas viven en zona endémica, a diferencia de la información recogida en el grupo de estudio, sólo una de ellas vivió en casa de adobe en el pasado (6,3%), pero la mayoría (62,5%) conocía las vinchucas. Algunas de estas madres (25%), las conocieron en lugares que frecuentaban durante la niñez (Camisa y Zapallar, Salamanca). Sólo una de las madres encuestadas (6,3%), señala haber sido picada por vinchucas. Esta información se diferencia en forma significativa de los antecedentes epidemiológicos del grupo en estudio, lo que supone la utilidad de la aplicación de la encuesta epidemiológica para estudios de grupos familiares. Es así como muchas madres no chagásicas, desconocían hasta ahora, la condición de chagásicas de las abuelas (su propia madre), información relevante en el control clínico de pacientes chagásicos crónicos. El estudio electrocardiográfico de madres y abuelas, evidenció que 20 madres (62,5%) y 10 (35,7%) abuelas, tienen alteraciones que requieren estudios posteriores, incluso implantación de marcapasos, condición observada aproximadamente en el 30% de los pacientes chagásicos crónicos (Apt *et al.*, 2005).

La disminución de la seropositividad en la población se ha visto favorecida por políticas habitacionales desarrolladas para el área rural de nuestro país, que han permitido importantes avances en grupos humanos que presentaban graves deficiencias de habitabilidad (materialidad o saneamiento) (MIDEPLAN, 1998) El otorgamiento de subsidios rurales permitió que dicho déficit disminuyera al 9,9% en el año 1998, en comparación con el 16,7% informado para el año 1990 (MIDEPLAN, 2000). Junto a ello, la cobertura de viviendas rurales electrificadas en la IV Región ascendió de un 54% a un 79% entre los años 1992 y 2002 (CNE, 1992-2002). El nivel educacional juega un rol importantísimo en la disminución de la incidencia de la enfermedad de Chagas; en 1907 el 49,7% del total de la población de Chile era analfabeta, cifra que cayó drásticamente en el

censo efectuado durante el año 2002 llegando solo a un 4,3%. En la IV región de un total de 68.277 habitantes de 10 años o más, hay 5.582 personas analfabetas, es decir en la región hay un 91,82% de alfabetismo (INE, 2002).

Finalmente, otro aspecto que fue evaluado en esta memoria de título, fue la presencia de animales domésticos en los domicilios de madres chagásicas y no chagásicas. Rios (1989), en ausencia de datos fidedignos, realizó un estudio tendiente a obtener datos serológicos mediante un método confiable (Hemoaglutinación Rápida Indirecta), encontrando 27 bovinos positivos (13,36%), 40 caninos (19,80%) y 34 équidos positivos (16,83%). Canals (1996), haciendo referencia a este mismo punto, informa que los reservorios más importantes de *T. cruzi* serían: el perro (8,5%) y el gato (8,1%) entre los domésticos y *Chinchilla lanigera* (9,4-30,6%), *Octodon degus* (5,3-8,3%), *Abrocoma benetti* (7,3-36%) y *Phyllotis darwini* (1,5-10%) entre los silvestres. Además, debemos tener en consideración que en Chile las explotaciones caprinas tienden a concentrarse en más de un 60% en manos de pequeños productores (agricultura familiar campesina), siendo la IV Región la que concentra la mayor cantidad de ellas. Los caprinos son una de las especies domésticas reservorio del *T. cruzi* (Alcaíno, 1993), y es por esta razón que la desinformación de estos pequeños productores con respecto a la epidemiología de la enfermedad de Chagas, sumado al hecho que sus caprinos recorren grandes distancias entre el ambiente peridomiciliario y silvestre durante el forrajeo, es que se convierten en un factor de riesgo constante de infección para sus dueños. Los datos anteriores evidencian la persistencia de la infección chagásica en animales domésticos en el domicilio o peridomicilio de viviendas de zona endémica. Nuestro estudio, no determinó la infección chagásica en los animales domésticos, pero sí su presencia, encontrándose que en un 65.6% de los hogares del grupo de estudio habían animales domésticos. En el grupo control el 62,5% de las familias tiene animales domésticos. En este estudio llama la atención que el perro es la especie más representativa en los hogares (95,24%) (grupo estudio y grupo control). Estos animales están tomando un rol de mayor importancia; el tipo de tenencia en estos lugares, les permite deambular libremente o acompañar a sus dueños en las labores agrícolas, entre el ambiente silvestre, domiciliario y peridomiciliario, lo que les confiere mayor susceptibilidad a adquirir la enfermedad desde un vector triatomino por picadura o por vía oral al consumir otro mamífero infectado (Coura, 2006). Por otra parte la transmisión de la enfermedad depende del contacto parasito-hospedero,

estudios sugieren que en situaciones de limitación de hospederos nativos, *M. spinolai* es capaz de compensar incrementando su ámbito de hogar, eventualmente incorporando nuevos hospederos a su dieta y diversificando las rutas de transmisión de *T. cruzi*. (Bottomahan *et al.*, 2001). Esto ha hecho que se realicen trabajos por medio de la vacunación experimental en perros con cepas de *Trypanosoma rangeli*, encontrándose que efectivamente, se redujo la parasitemia en los individuos vacunados, planteándose que la minuciosa vacunación en perro podría ser otra estrategia más para disminuir la infección en humanos (Basso *et al.*, 2007). Para evaluar la real importancia epidemiológica que la presencia de animales sinantrópicos tiene en las familias de madres chagásicas y no chagásicas, se debe efectuar estudio de la infección chagásica en ellos, objetivo no considerado en el presente estudio.

Durante la realización de este trabajo, y en especial por medio de la encuesta epidemiológica, pudimos percatarnos que, si bien desde 1999 se notificó la interrupción de la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de Chagas; en la actualidad las personas realizan desinfecciones domiciliarias en forma privada con productos que no son adecuados; ya que se requiere de un insecticida que tenga efecto residual de alta calidad que se mantenga en el tiempo (Cardinal *et al.*, 2007), lo que no sucede con los insecticidas que se ellas están aplicando. La eficiencia podría incluso mejorarse en la medida que el control vectorial se realizara de asociado a la estacionalidad de los triatomíneos (Dohna *et al.*, 2007).

La educación que en la zona realizan los servicios de salud sobre la enfermedad de Chagas, es de suma importancia para la prevención, los seguimientos de los casos positivos encontrados y para la efectividad del tratamiento, sobre todo para casos congénitos, en que el resultado de la terapia depende de la importancia y urgencia que la madre otorgue a la enfermedad. Las dificultades para trasladarse desde los domicilios a los centros de salud y viceversa por ruralidad de la zona, hace que sea imprescindible que la madre esté informada y conciente de las implicancias que la enfermedad de Chagas podría traer a su grupo familiar, por el bienestar de su RN y de ella misma.

Por último, se hace cada vez más necesaria la creación de un Registro Chagásico Nacional, que incluya todos aquellos casos pesquisados en Bancos de Sangre, en laboratorios, en maternidades, etc.

IX. CONCLUSIONES

- Mediante el presente trabajo queda demostrado que mediante un estudio serológico y parasitológico retrospectivo y seriado, es posible detectar casos de transmisión vertical de *T. cruzi* no pesquisados en el parto.
- Solo en un caso de un RN seguido serológica y parasitológicamente hasta los 12 meses de edad, es posible asegurar que corresponde a transmisión vertical. En todos los otros casos positivos encontrados (madres, abuelas e hijos), incluso en el niño de 8 años (hermano de CI) no es posible descartar la transmisión vectorial, debido a la presencia de *T. infestans* y *M. spinolai* infectados en la zona.
- La enfermedad de Chagas constituye un problema de Salud Pública, en que la vigilancia medioambiental representa un pilar fundamental en el control de la transmisión, aún hoy en día. Involucra a grupos familiares, por lo tanto, debería ser abordada multidisciplinariamente, evaluando epidemiológicamente todo el entorno del caso índice y clínicamente a todo el grupo familiar, ya que, la enfermedad es generalmente silente, y como se observó en este estudio, muchos pacientes chagásicos no tienen conciencia de estar infectados, pues no presentan sintomatología ni signología.
- La educación para la salud, la vigilancia epidemiológica medio ambiental y clínica en esta zona hiperendémica, constituyen los pilares fundamentales del control de la transmisión de la enfermedad de Chagas en esta región de Chile.



ANEXO 1

FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA LA PROVINCIA DEL CHOAPA
Pacientes con serología positiva para la infección por *Trypanosoma cruzi*

Nombre		Fecha Nac.	
Domicilio			
Localidad		Ciudad	
Teléfono		Hospital	

1.- Datos Epidemiológicos

a) La casa donde vive actualmente

- ¿De que materiales está construida? (Muros y techo)

- ¿Desde que año la habita? _____
- ¿Ha visto vinchucas en esta casa? _____

Domicilios anteriores	¿Entre qué años vivió ahí?	¿Ahí había vinchucas?

b) Presencia de animales

- ¿Tiene animales en su casa? SI NO
- ¿Qué animales posee?

- ¿De que están hechos los corrales? (Materiales de techo y muros)

c) Conocimiento de la vinchuca

- ¿Conoce a la vinchuca? SI NO
- ¿Dónde la conoció? _____

d) Exposición al vector

	Si	No
Ha sido picado		
Se ha desinfestado su vivienda		
Cuando fue la ultima vez que se desinfestó		

e) Datos Familiares

- ¿Tiene más hijos? SI NO

Nombre	Fecha de Nac.	Test. Chagas	Fecha

- ¿Tiene a su Madre Viva? SI NO

Nombre	Fecha de Nac.	Test. Chagas

- ¿Tiene algún otro Familiar que tenga Chagas? SI NO

Nombre	A. Parentesco

f) ¿Ha recibido Transfusiones? SI NO Fecha: _____

g) ¿Trabaja fuera del hogar? SI NO

Que actividad realiza (Si la respuesta anterior es afirmativa):

2) Datos de Caso Índice

Nombre	Fecha Nac.	Seguimiento 1	Seguimiento 2

Exámenes aplicados:

II. Examen	A. Resultado
Parasitológico Directo	
Serología ELISA	
Corte Histológico Placenta	
PCR	

2.- Datos Clínicos

1) Sospecha de enfermedad:

a) Personal :

- 1) Palpitaciones
- 2) Crisis sincopales
- 3) Dolor precordial
- 4) Insuficiencia cardiaca

b) Familiares

		SI	NO
B. Enfermos del corazón			
¿Quiénes?			
C. Muertes bruscas			
¿A qué edad?			
		SI	NO
Abortos repetidos			

3.- Enfermedad actual

- a. Duración :
 - i. 0 a 6 meses
 - ii. 6 meses a 1 año
 - iii. más de 1 año
- b. Asintomático
- c. Sintomático

4.- Examen Físico

(a) Pulso "n" / min. _____

(b) Ritmo

- (i) Arrítmico
- (ii) Paradojal
- (iii) Bisferiens

(c) Presión arterial _____ mm Hg.

(d) Auscultación:

- (i) Ruidos normales
- (ii) Patológicos
- (iii) Ruido
- (iv) Ruido
 1. Soplo
 2. SSS
 3. OSO
 4. DDD
 5. Ddo

	Mitral	Tricusp.	Aorta	D. Pulmonar
Area				
	1 / 4	2 / 4	3 / 4	4 / 4
Grado				
Signos de falla ventricular derecha				
Signos de falla ventricular izquierda				
Signos de falla Biventricular				

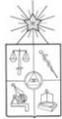
5.- ECG

- (1) Normal
- (2) Patológico
 - (a) Arritmias
 - (b) Bloqueos A-V
 - (c) Bloqueo I-V
 - (d) Sugerente de Enfermedad de Chagas

6.- Laboratorio

III. Hemaglutinación Indirecta	
ELISA IgG	
Inmunofluorescencia Indirecta	
Anticuerpos Líticos	
PCR Sangre	
Colesterol	
Triglicéridos	
Otros	
Xenodiagnóstico	
PCR	

Observaciones



ANEXO 2

PROTOCOLO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE ENFERMEDAD DE CHAGAS

(Extractado de Astorga *et al.*, 1998; Zulantay *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 2000)

A. FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE IFI

La técnica de inmunofluorescencia, introducida por Coons *et al.* (1941), permite detectar antígenos mediante la reacción antígeno-anticuerpo, para ello se utiliza un marcador con fluorurocromo, que emite fluorescencia es decir, luz a partir e una fuente de energía no térmica.

La Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta, utilizada en este estudio, se basa en la detección de anticuerpos dirigidos hacia *T. cruzi*, frecuentemente en forma de cultivo epimastigote, que son reconocidos por los anticuerpos de las personas infectadas. Luego un segundo anticuerpo (anti IgG humana) marcado con un Isocianato de fluoresceína (fluorocromo que absorbe la luz azul y emite fluorescencia verde) reconoce al anticuerpo específico que ha reconocido al parásito; esto permite observarlos en un microscopio para fluorescencia, que posee luz ultravioleta. El fluorocromo se excita, permitiendo la identificación visual de las reacciones positiva.

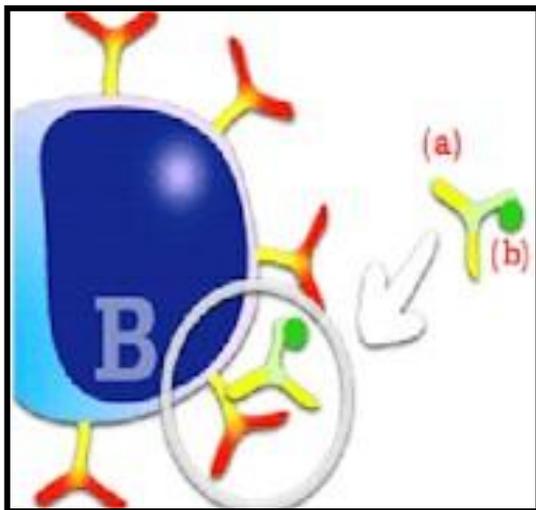


Figura 6

TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- (a) Anticuerpo de Cabra anti-IgG humana
- (b) Isocianato de Fluoresceína (Fluorurocromo)

B. PREPARACIÓN DE MATERIAL

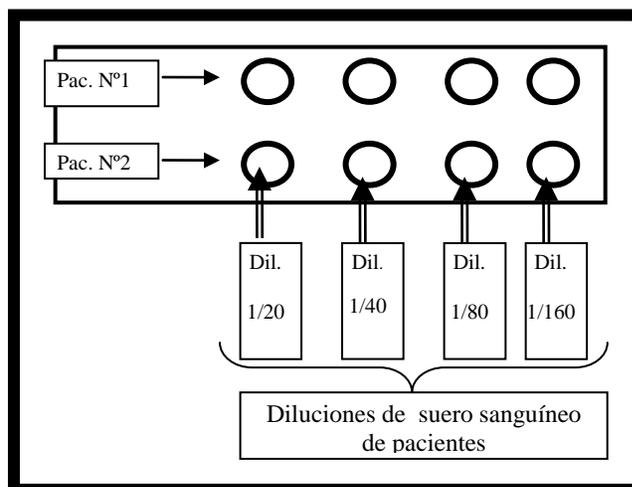


Figura 7

Placas con diluciones para Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta

1. Placas

- Vidrios portaobjetos desengrasados
- Pintura y/o esmalte a prueba de agua y buffer fosfato 7.2

Se disponen los vidrios portaobjetos y se pintan en su superficie con pintura y/o esmalte 8 círculos según diagrama (Ver figura).

Una vez pintados los círculos, las placas se incuban en estufa a 100°C por 20 minutos y luego se conservan en freezer de -20°C (placas enfrentadas y envueltas en papel de aluminio).

Los pocillos superiores e inferiores corresponderán a dos pacientes, respectivamente.

2. Antígeno figurado de *Trypanosoma cruzi*

- Se retiran las placas del freezer de -20°C y se incuban a temperatura ambiente.
- La solución parasitaria consta de formas epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuén, que han sido cultivadas en medio Diamond suplementado con 5% de SFB e incubadas a 28°C. La cosecha se realiza durante la fase exponencial de crecimiento de los parásitos por centrifugación a 500G por 10 min a 4°C. Las formas parasitarias son fijadas con buffer 7.2-formalina 1%.
- Estandarizar la solución antigénica con buffer fosfato 7.2 para un máximo de 50 formas epimastigotes por campo 40x.
- Colocar en cada pocillo 25µl de solución parasitaria.

- Dejar decantar por 2 a 4 minutos
- Retirar el exceso de cada pocillo (aprox.15µl)
- Conservar las placas enfrentadas y envueltas en papel de aluminio a -20°C, hasta su uso.

3. Buffer fosfato 7.2

- **Buffer fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0,15 M**
 - Para 1 litro de buffer se necesitan 20,41 g de fosfato de potasio. Llevar a 1000 ml con H₂O destilada. (1M: 136,09 g en 1000 ml de H₂O destilada).
- **Buffer fosfato de sodio (Na₂HPO₄) 0,15 M**
 - Para 1 litro de agua se necesitan 21,3 g de fosfato de sodio. Llevar a 1000 ml de H₂O destilada (1M: 124,63 g en 1000 ml de H₂O destilada)
- **Buffer fosfato pH 7,2**
 - Para 1 litro de buffer fosfato pH 7,2 se necesita mezclar:
 - 8 g Cloruro de Sodio
 - 28 ml de KH₂PO₄ 0,15 M
 - 72 ml de Na₂HPO₄ 0,15 M
 - csp 900 ml de H₂O destilada
 - Mezclar durante 15 minutos en agitador magnético, traspasar a recipiente y etiquetar.

4. Inactivación y dilución de sueros

- **Inactivación:** Incubar los tubos que contienen el suero a 56°-57°C durante 30 minutos en Baño María con el fin de inactivar el Sistema del Complemento.
- **Diluciones:** Para preparar 5 diluciones, se colocan 450µl de buffer fosfato pH 7,2 en el primer tubo (dilución 1/10) y en los 4 tubos restantes (diluciones 1/20; 1/40; 1/80; 1/160) 250µl de Buffer fosfato pH 7,2. Colocar 50 µl de suero inactivado en el tubo dilución 1/10 y homogeneizar bien con ayuda de la micropipeta; de este tubo tomar 250µl y diluirlo en el tubo con la asignación 1/20 mezclando bien, tomar del tubo 1/20 unos 250µl y diluirlos en el tubo

con la asignación 1/40 y mezclar bien; tomar de este tubo 250µl y agregarlo al tubo con la asignación 1/80 y finalmente, tomar del tubo 1/80, 250µl y agregarlos al tubo con asignación 1/160, que quedará con un volumen final de 500µl. Es muy importante en el proceso descrito, la homogeneización de las soluciones, con el fin que los anticuerpos presentes en el suero estén adecuadamente diluidos.

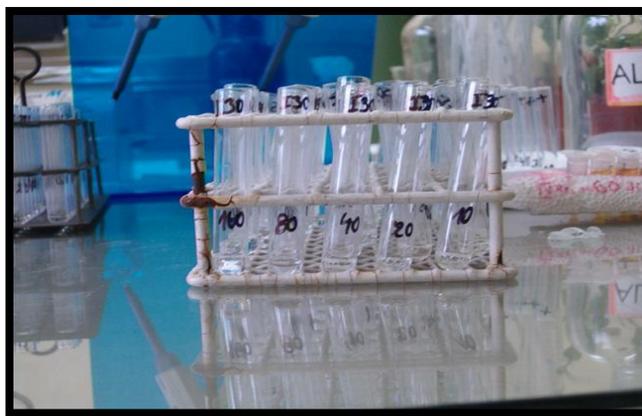


Figura 8
Tubos marcados con las diluciones para IFI

- Luego de una correcta identificación, cargar las placas previamente descongeladas que contienen la solución parasitaria con 15µl de suero diluido por pocillo, partiendo de la mayor dilución (1/160), se limpia la punta y se cargan nuevamente 15µl pero ahora de dilución 1/80 y así sucesivamente. Al llegar a la dilución 1/20 se cambia la punta. La dilución 1/10 no debe colocarse en los pocillos.

C. REACCION DE IFI

- Colocar las placas previamente cargadas con las diluciones de suero en cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos.
- Realizar 2 lavados de 10 minutos cada uno con solución Buffer fosfato pH 7,2.
- Secar a temperatura ambiente hasta que todos los pocillos de las placas estén completamente secos (se puede ayudar con ventilador frío).

- Colocar 15µl de solución de conjugado para IFI, previamente estandarizado, en cada pocillo (Conjugado: 1800µl de Buffer fosfato pH 7,2; 300 µl de Azul de Evans y 2,5µl de conjugado Fluoline G (Inmunoglobulina de cabra anti-IgG humana marcada con isotiocianato de fluoresceína. BioMerieux, Ref. 75692).
- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos.
- Realizar dos lavados de 10 minutos cada uno con Buffer fosfato pH 7,2
- Lavado de las placas durante 30” con H₂O destilada.
- Secar completamente las placas a temperatura ambiente.
- Agregar 8µl de glicerina tamponada 1:1 con buffer fosfato, previamente homogeneizada, a cada pocillo.
- Cubrir los pocillos con cubreobjetos.
- Leer al microscopio de fluorescencia con objetivo 40x.
- Reacción negativa: formas epimastigotes de *T. cruzi* no fluorescentes. Se puede observar un campo verde opaco con tintes rojos.
- Reacción positiva: epimastigotes fluorescentes (color verde) en su membrana y/o citoplasma.
- Título diagnóstico: 1/20

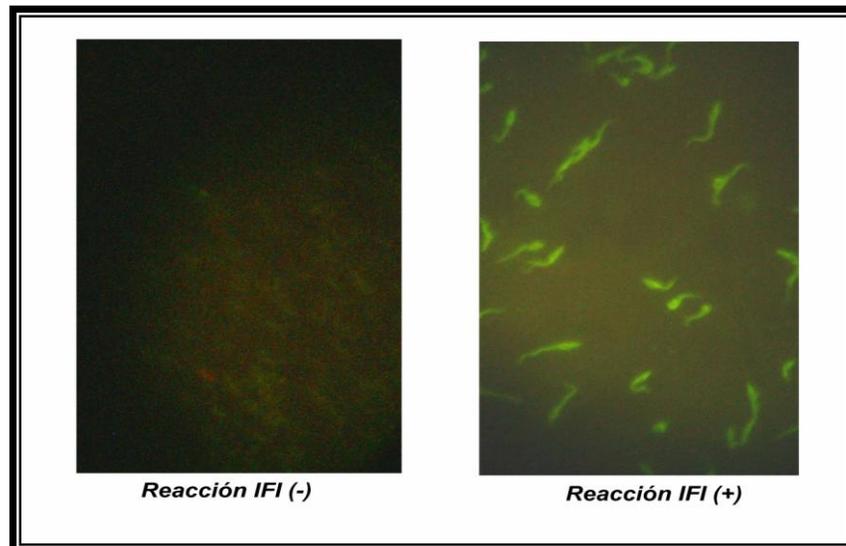


Figura 9
Fotografía de inmunofluorescencia indirecta (IFI) observada mediante microscopio de IFI.
(Reacción negativa y positiva).

X. BIBLIOGRAFÍA

- **ALCAÍNO, T. V.** 1993. Estudio serológico de la enfermedad de Chagas en caprinos de las localidades de San José de Maipo, Tiltil y Colina, Región Metropolitana. Memoria para optar al Título de Médico veterinario. Fac. Cs. Veterinarias. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- **APT, W.; REYES, H.** 1986. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas en Chile. Distribución geográfica, índices de infección en vectores y en humanos. *Parasitol. al Día* 10: 94-101.
- **APT, W.; REYES, H.** 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol. al Día* 14: 23-40.
- **APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SOLARI, A.; SÁNCHEZ, G.; MUNDACA, K.; CORONADO, X.; RODRÍGUEZ, J.; GIL, L.C.; OSUNA, A.** 2005. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99(8): 733-741.
- **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M. I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN A. M.; SAPUNAR, J.; TORRES M.; ZULANTAY, I.** 2006. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. [en línea] <<http://webhosting.redsalud.gov.cl/minsal/archivos/CHAGAS.pdf>> [consulta 29-09-07].
- **ASTORGA, B; LORCA, M Y THIERMANN, E.** ,1988. Determinación del título diagnóstico de la reacción de inmunofluorescencia indirecta para enfermedad de Chagas en Chile. *Parasitol. al Día*, 12 (3): 132-135.
- **AYALA, F.** 1993. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol. Res.* 26: 47-63.
- **BASSO, B.; CASTRO, I.; INTROINI, V.; GIL, P.; TRUYENS, C. MORETTI, E.** 2007. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine.* Mar 7.
- **BITTENCOURT, L.** 1992. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* Sep-Oct; 34(5):403-8.
- **BOTTO-MAHAN, C.; CATTAN P. E.; ACUÑA, M.; EHRENFELD, M.; GARÍN, C.; PINOCHET, A.; CANALS, M.** 2001. Potencial de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por la vinchuca silvestre *Mepraia spinolai*: variación estacional y latitudinal en la interacción vector-hospedero. en 1ª Reunión Binacional de Ecología Chilena-Argentino, XX Reunión Argentina de Ecología y X Reunión de la Sociedad

de Ecología de Chile, realizada en San Carlos de Bariloche en Abril de 2001. Proyecto financiado por FONDECYT 198-0768 y Milenio P99-103-F-ICM.

- **BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M.** 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2º Edição. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil.
- **BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.;** 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.*;30(1):35-44.
- **CECERE, M.; VÁZQUEZ-PROKOPEC, G.; CEBALLOS, L.; GUREVITZ, J.; ZÁRATE, J.; ZAIDENBERG, M.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.** 2006. Comparative Trial of Effectiveness of Pyrethroid Insecticides Against Peridomestic Populations of *Triatoma infestans* in Northwestern Argentina. *J. Med. Entomol.* 43: 902-909.
- **CANALS, M.** 1996. Insectos hematófagos y sus enfermedades. TECNO VET; Año 2 N°3, diciembre. [en línea]
<http://www.tecnovet.uchile.cl/CDA/tecnovet_articulo/0,1409,SCID%253D9411%2526ISID%253D446,00.html> [consulta 09-05-08]
- **CANALS, M.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E.** 2000. Situation of *Mepraia spinolai*, a will vector for Chagas disease in Chile, in relation to others vectors from the perspective of their feeding profile. *Rev. Med. Chile* 128(10):1108-12.
- **CÁRDINAL, M.; LAURICELLA, M.; MARCET, P.; OROZCO, M.; KITRON, U.; GÜRTLER, R.** 2007. Impact of community-based vector control on house infestation and *Trypanosoma cruzi* infection in *Triatoma infestans*, dogs and cats in the Argentine Chaco. *Acta Trop.*;103(3):201-11.
- **CARLIER, Y.; TORRICO, F.** 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36(6): 767-771.
- **CARREÑO, H.; ROJAS, C.; AGUILERA, X.; APT, W.; MILES, M.; SOLARI, A.** 1987. Schizodemes analices of *T. cruzi* zymodemes from Chile. *Exp. Parasitol.* 64: 252-260.
- **COMISIÓN NACIONAL DE ENERGÍA (CNE).** 1992-2002. La electrificación rural en Chile. Logros de un programa de gobierno. Gobierno de Chile. 6 páginas.
- **CONTRERAS, S.; FERNÁNDEZ, M.; AGÜERO, F.; DESSE, J.; ORDUÑA, T.; MARTINO, O.** 1999. Enfermedad de Chagas-Mazza congénita en Salta, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32: 633-666.
- **COURA, J.** 2006. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39 Suppl 3:113-117.

- **DOHNA, H.; CECERE, M.; GÜRTLER, R.; KITRON, U.; COHEN, J.** 2007. Re-establishment of local populations of vectors of Chagas disease after insecticide spraying. *J. Appl. Ecol.* 44(1):220-227.
- **DVORAK, J.A.** 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: Biological and medical implications. *J. Cell. Biochem.* 24: 357-371.
- **FRÍAS, D.; HENRY, A.; GONZÁLEZ, C.R.** 1998. *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 71: 177-188.
- **FERNANDES, C.; MURTA, S.; CERÁVOLO, I.; KRUG, L.; VIDIGAL, P.; STEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A.J.** 1997. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 92 (3): 343-351.
- **FERREIRA, L.; BRITTO, C.; CARDOSO, M.; FERNANDES, O.; REINHARD, K.; ARAÚJO, A.** 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. Elsevier. *Acta Tropica* 75: 79-84.
- **FONSECA, S.M Y ROMANHA, A.J.** 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94 (1):* 177-180.
- **GARCIA, A.; BAHAMONDE, M.; VERDUGO, S.** 2001 Infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi*: Situación en Chile. *Rev. Med. Chile.* 129(3): 330-332. ISSN 0034-9887.
- **GOBLE, F. C.** 1970. South American Trypanosomas . **In** Immunity to Parasitic Animals. Jackson, G. J .; Herman, R.; Singer, I. editors. Vol. 2. Appleton-Century-Crofts, New York.
- **GODOY, L.; GONZALEZ, S.; ZULANTAY, I.; CORRAL, G.; SALAS, C.; GOMEZ, M.; POZO, L.; PEREDA, P.; GUZMÁN, C.; ALDUNATE, M.; APT, W.** 2008. Prevalencia de la infección chagásica en mujeres embarazadas de la Provincia de Choapa. IV Región. Chile. Periodo 2005-2007. **In:** I congreso chileno de parasitología. 10-11 enero, Antofagasta, Chile. Financiamiento proyectos DI-Sal 05/17-2. Universidad de Chile y comunidad francesa de Bélgica Región Valona 06/2006-2009. Libro de resúmenes. Pag. 53.
- **GOMEZ M.; GOMEZ M. A.** 2000. Inmunohistoquímica (I): Técnicas de inmunofluorescencia. **In** Manual de Laboratorio Clínico Diagnóstico. Anatomía Patológica. Editorial Mc Graw Hill. Bogotá, Colombia. pp. 331-340.
- **HERMANN, E.; ALONSO-VEGA, C.; BERTHE, A.; TRUYENS, C.; FLORES, A.; CORDOVA, M.; MORETTA, L.; TORRICO, F.; BRAUD, V.; CARLIER, Y.**

2006. Human congenital infection with *Trypanosoma cruzi* induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells. *Pediatr. Res.* 60(1):38-43.
- **ID BOUFKER, H.; ALEXANDRE, H.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C.** 2006. Infertility in Murine Acute *Trypanosoma cruzi* Infection Is Associated with Inhibition of Pre-Implantation Embryo Development. *Am. J. Pathol*; 169:1730-1738.
 - **LORCA, M.; BEROIZA, A.; MUÑOZ, P.; GUAJARDO, U.; SILVA, J.; CANALES, M.; ATÍAS, A.** 1987. Estudio materno infantil de enfermedad de Chagas en zonas endémicas. III: Salamanca, Valle del Choapa, Chile. *Parasitol. al día*; 11(3):97-100.
 - **LORCA, M.; GARCIA, A.; CONTRERAS, M.; SCHENONE, H.; ROJAS, A.** 2001. Evaluation of a *Triatoma infestans* elimination program by the decrease of *Trypanosoma cruzi* infection frequency in children younger than 10 years, Chile, 1991-1998. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65: 861-864
 - **LUQUETTI, A.; FERREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; TAVARES, S.; RASSI, A.; DIAS, J.; PRATA, A.** 2005. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: estimation of prevalence based on preliminary data of national serological surveys in children under 5 years old and other sources *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38(2):24-26.
 - **MACHADO, C.; AYALA, F.** 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98(13):7396-7401.
 - **MINISTERIO DE PLANIFICACIÓN Y COOPERACIÓN. MIDEPLAN.** 1998. Documento 1992-1998. Encuesta CASEN. Gobierno de Chile.
 - **MINISTERIO DE PLANIFICACIÓN Y COOPERACIÓN. MIDEPLAN.** 2000. Situación del Sector Rural en Chile. Documento N° 7. Gobierno de Chile. 86 pág.
 - **MJIHDI, A.; LAMBOT, M.; STEWART, I.; DETOURNAY, O.; NOE, J.; CARLIER, Y.; TRUYENS, C.** 2002. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am. J. Pathol.* 161(2): 673-680.
 - **MILES, M.A.; TOYE, P.J; OSWALD, S.C; GODFREY, D.G.** 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71: 217-225.
 - **MILES, M.A.; SOUZA, A.A.; POVOA, M.M.; SHAW, J.J; LAINSON, R.; TOYE, P.J.** 1978. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 272: 819-821.

- **MONTAMAT, E.; DURAND, S.; BOCCO, J.L.; DE LUCA D' ORO, G.M.; BLANCO, A.** 1999. Identification of *Trypanosoma cruzi* Zymodemes by Kinetoplast DNA Probes. J. Euk. Microbiol. 46 (2): 155-159.
- **MORA, M.; SANCHEZ NEGRETTE, O.; MARCO, D.; BARRIO, A.; CIACCIO, M.; SEGURA M.; BASOMBRIÓ, M.** 2005. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. J Parasitol. 91(6):1468-1473.
- **MUÑOZ, C.**1990. Importancia clínica de la infección por *Trypanosoma cruzi* en niños. Tesis de Magíster en Ciencias Medicas mención Parasitología. Santiago. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- **NOIREAU, F.** 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. In Chagas la enfermedad en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del programa de control. Cassab, J.A; Noireau, F.; Guillén, G. Ministerio de Salud y Previsión Social. La Paz, Bolivia. pp 17-47.
- **OLEA, A.** 1998. Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea]. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. <<http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm>> [Consulta 17-08-2006]
- **ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD (OPS)** 2006. XVª Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación del *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión de la tripanosomiasis americana por transfusión. INCOSUR-Chagas. Brasilia 6 al 9 de Junio.
- **PINTO DIAS, J.C.** 1984. Enfermedad de Chagas. Epidemiología-Clínica-Terapéutica. Programa de Salud Humana. Buenos Aires, Argentina. pp. 1-106.
- **RÍOS, A.** 1989. Estudio de la enfermedad de chagas, en animales sinantrópicos domésticos en un área hiperendémica (Valle de Limarí, IV Región, Chile). [en línea] Avances en Medicina Veterinaria. 4(2). <http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/CDA/avan_vet_articulo/0,1426,SCID%253D9697%2526ISID%253D441%2526PRT%253D0,00.html> [consulta 17-08-2006]
- **SANCHEZ, O.; MORA, M.; BASOMBRIÓ, A.** 2005. High Prevalence of Congenital Infection and Family *Trypanosoma cruzi* Clustering in Salta, Argentina. Pediatrics. 115; 668-672.
- **SCHAUB, G.; BÖKER, C.** 1987. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* studied by scanning electron microscopy: influence of blood uptake by the bug. Parasitol Res. 73(5): 417-20.

- **SCHENONE, H.; CRISTENSEN, H.; DE VASQUEZ, A.; GONZALEZ, C.; MENDEZ, E.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F.** 1985. Fuentes de alimentación de triatomas domésticos y su influencia epidemiológica en relación a enfermedad de Chagas en áreas rurales de siete regiones de Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 40: 34-38.
- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.; BORGONO, J.; ROJAS, A.; TELH, P.; SALINAS, P.** 1989. Algunas características epidemiológicas, climáticas y parasitológicas de la enfermedad de Chagas congénita en Chile. *Pediatría (Santiago)*; 32: 65-72.
- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M. DEL C.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F.** 1995. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Frecuencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* por grupo de edad y por regiones. *Bol. Chil. Parasitol.* 50:84-86.
- **SCHENONE, H.** 1999. Xenodiagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94(1): 289-294.
- **SCHOFIELD, C.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R.** 2006. The future of Chagas disease control. *Trends in Parasitology*, 22 (12): 583-588.
- **SOLARI, A.; MUÑOZ, S.; VENEGAS, J.; WALLACE, A.; AGUILERA, X.; APT, W.; BRENIERE, S.F.; TIBAYRENC, M.** 1992. Characterization of Chilean, Bolivian and Argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Exp. Parasitol.* 75: 187-195.
- **SOLARI, A.; ORTÍZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; CAMPILLAY, R.; CONTRERAS, P.; SALINAS, A.; ROJAS, A.; SCHENONE, H.** 2001. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (4):515-519.
- **TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J.** 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 115-119.
- **TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J.** 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42(2): 277-292.
- **TIBAYRENC, M.** 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis.* 28;2(1):12.
- **TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, I.** 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy, outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non infected newborns in Bolivia. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 70(2), 201-209

- **VENEGAS, J.; ORTIZ, S.; MUÑOZ, S.; SOLARI, A.** 1997. Molecular karyotype and schizodeme analices of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean triatomines. *Parasitology* 115: 41-46.
- **VIRREIRA, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; SOLANO, M.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M.** 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. : *Am J Trop Med Hyg.* 68(5):574-82.
- **VIRREIRA, M.; ALONSO-VEGA, C.; SOLANO, M.; JIJENA, J.; BRUTUS, L.; BUSTAMANTE, Z.; TRUYENS, C.; SCHNEIDER, D.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M.** 2006. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75(5):871-9.
- **WENDELL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, A.; RASSI, A.** 1992. Chagas' disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. *ISTB, Sao Paulo, Brazil.*
- **ZULANTAY, I.; APT, W.; RODRIGUEZ, J.; VENEGAS, J.; SANCHEZ, G.** 1998. Serologic evaluation of treatment of chronic Chagas disease with allopurinol and itraconazole. *Rev. Med. Chil.* 126 (3): 265-270.
- **ZULANTAY, I.; BOZAN, F.; SALAS, C.; ZILLERUELO, N.; OSUNA, A.; GIL, L.; RODRÍGUEZ, J.; ROJAS, A.; EGEA, J.; APT, W.** 2004. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliaria y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. *Parasitol. Latinoam.* 59: 93-8.
- **ZULANTAY, I.; APT, W.; GIL, L.C.; ROCHA, C.; MUNDACA, K.; SOLARI, A.; SÁNCHEZ, G.; RODRIGUEZ, C.; MARTÍNEZ, G.; DE PABLOS, L.M.; SANDOVAL, L.; RODRÍGUEZ, J.; VILCHEZ, S.; OSUNA, A.** 2007. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 101(8): 673-679.