



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EVALUACIÓN DE PARTIDORES NUCLEARES
Y KINETOPLASTÍDICOS MEDIANTE LA REACCIÓN
DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR), EN LA DETECCIÓN
DE *Trypanosoma cruzi* EN MUJERES CHAGÁSICAS CRÓNICAS
Y SUS RECIÉN NACIDOS**

MACARENA PAULINA LEAL ARREDONDO

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

PROFESOR GUIA: T.M. PhD. INÉS ZULANTAY ALFARO

Financiado por Proyectos FONDECYT 1080445, 1100768
y Proyecto 06/2009 Región Valona de Bruselas-Bélgica

**SANTIAGO, CHILE
2010**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACIÓN DE PARTIDORES NUCLEARES Y KINETOPLASTÍDICOS MEDIANTE LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA (PCR), EN LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN MUJERES CHAGÁSICAS CRÓNICAS Y SUS RECIÉN NACIDOS

MACARENA PAULINA LEAL ARREDONDO

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : INES ZULANTAY ALFARO
PROFESOR CONSEJERO: FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO: JOSE PIZARRO

SANTIAGO, CHILE
2010

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este trabajo he contado con la ayuda de muchas personas quienes de diversa forma me expresaron su apoyo, cariño y amistad. Primero que todo quiero expresar mis más sinceros agradecimientos al Dr. Apt y en especial a la Dra. Inés Zulantay por su paciencia, dedicación y entrega en el desarrollo de este estudio, por introducirme en este mundo maravilloso de la investigación y motivarme a seguir en este rumbo, el cual seguiré con la ayuda de Dios.

También quiero agradecer a las personas que me acompañaron día a día en la realización de esta tesis. A Gabriela Martínez, la Gaby, por enseñarme como trabajar en un laboratorio, por su paciencia, colaboración, simpatía y por sobre todo su amistad. Gracias por tu apoyo y ánimo que me ayudaron a terminar con éxito esta etapa. A Rosa Ávila, Rosita, por escucharme y aconsejarme, darme su apoyo y cariño. Gracias por tu amistad.

A ustedes les agradezco el acogerme en el laboratorio y hacerme sentir una más del equipo.

Finalmente agradezco a quienes estuvieron siempre conmigo y que formaron parte de esta etapa de mi vida. Primero a mi familia, mis padres Robinson y Sonia, y hermanas Mónica y Patricia que me dieron su apoyo, cariño y aliento para concluir con éxito mi tesis. También a mis amigos, que me acompañaron en los momentos más difíciles cuando el cansancio y estrés me superaban, gracias por su cariño y amistad.

A todos ustedes muchísimas gracias.

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA	4
i. Antecedentes del agente etiológico	4
ii. Antecedentes epidemiológicos	6
iii. Enfermedad de Chagas	9
iv. Diagnóstico	11
- PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	12
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVO GENERAL	15
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	16
i. Grupo de estudio	16
ii. Obtención de las muestras biológicas	16

iii. Clasificación de las muestras en estudio	16
iv. Extracción ADN kit Favorgen ®	17
a. Lisis Celular	17
b. Unión	17
c. Lavado	17
d. Elución	18
e. Conservación	18
v. PCR con partidores ADNk- <i>T. cruzi</i>	18
vi. PCR con partidores ADNn- <i>T. cruzi</i>	20
vii. Estandarización de la técnica PCR nuclear	20
a. Prueba 1	21
b. Prueba 2	22
c. Prueba 3	22
d. Prueba 4	22
viii. Confirmación de la condición de infectados de hijos de madres chagásicas	23
a. Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta	23
b. Reacción de Elisa	24
ix. Análisis estadístico	24

VII. RESULTADOS	25
i. Resultados estandarización PCRn	25
a. Resultados prueba 1	25
b. Resultados prueba 2	26
c. Resultados prueba 3	26
d. Resultados prueba 4	27
ii. Resultados de electroforesis de muestras control negativo (Grupo V)	27
iii. Aplicación de partidores Kinetoplastídicos (121-122) en la reacción de PCRk en muestras de madres y sus RN	29
a. Resultados PCRk Madres Chagásicas Grupo I	29
b. Resultados PCRk RN Grupo II	29
c. Resultados PCRk Madres Chagásicas Grupo III	30
d. Resultados PCRk RN Grupo IV	30
iv. Aplicación de partidores nucleares Tc1-Tc2 en el protocolo estandarizado de PCRn en muestras de madres y sus RN	31
a. Resultados PCRn Madres Chagásicas Grupo I	31
b. Resultados PCRn RN Grupo II	31

c. Resultados PCRn Madres Chagásicas Grupo III	32
d. Resultados PCRn RN Grupo IV	32
v. Resumen de resultados de los binomios Madre-RN sometidos a PCRk y PCRn	33
vi. Estudios Serológicos de Seguimiento al año de edad de RN	34
vii. Análisis estadístico	35
a. Análisis Grupo I. Tabla de Frecuencia y Asociación	35
b. Análisis Grupo III. Tabla de Frecuencia y Asociación	36
c. Análisis Grupo IV, comparación PCRk y PCRn en RN Prueba de McNemar	37
d. Análisis de sensibilidad y especificidad	37
IX. DISCUSIÓN	40
X. CONCLUSIONES	46
XI. BIBLIOGRAFÍA	47

INDICE DE TABLAS

		Página
TABLA 1	Concentraciones de reactivos utilizados en la preparación del Mix de PCRk, según la técnica descrita por Solari <i>et al.</i> , 2001 y Zulantay <i>et al.</i> , 2004.	19
TABLA 2	Especificación de temperaturas y tiempos por ciclo del programa de amplificación de ADN en termociclador utilizando partidores kinetoplastídicos (121-122).	19
TABLA 3	Protocolo de Mix para PCR nuclear descrito por Schijman (2008).	21
TABLA 4	Especificación de temperaturas y tiempos por ciclo del programa de amplificación de DNA en termociclador utilizando partidores nucleares (Tc1-Tc2).	21
TABLA 5	Protocolo de PCR nuclear modificado tras la prueba 1.	22
TABLA 6	Protocolo de PCR nuclear modificado tras Prueba 2.	23
TABLA 7	Resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los grupos, al aplicar las técnicas de PCRk y PCRn evaluadas en este estudio.	33
TABLA 8	Porcentaje de positividad con partidores kinetoplastídicos (121-122) y nucleares (Tc1-Tc2) en los grupos de estudio.	33
TABLA 9	Resultados de exámenes serológicos, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA, en muestras de sangre de RN (Grupo II), tomadas al año de edad.	34

TABLA 10	Resultados de exámenes serológicos, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA, en muestras de sangre de RN (Grupo IV), tomadas al año de edad.	34
TABLA 11	Análisis estadístico de madres PCRk negativo (Grupo I), con PCRn positivo.	35
TABLA 12	Análisis estadístico de madres PCRk negativo (Grupo I), y RN PCRk positivo.	35
TABLA 13	Análisis estadístico de madres PCRk negativo (Grupo I), y RN PCRn positivo.	35
TABLA 14	Análisis estadístico de madres PCRk positivo (Grupo III), con PCRn positivo.	36
TABLA 15	Análisis estadístico de madres PCRk positivo (Grupo III), y RN PCRk positivo.	36
TABLA 16	Análisis estadístico PCRk/PCRn de RN hijos de madres PCRk positivo (Grupo IV). Prueba McNemar, P-value=0,016.	37
TABLA 17	IFI versus PCRk en RN de los grupos II y IV.	38
TABLA 18	IFI versus PCRn en RN de los grupos II y IV.	38
TABLA 19	IFI versus ELISA en RN de los grupos II y IV.	39

INDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Resultados prueba 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2.	25
FIGURA 2	Resultados prueba 2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2.	26
FIGURA 3	Resultados prueba 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2.	26
FIGURA 4	Resultados prueba 4. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2.	27
FIGURA 5	Control negativo (Grupo V). Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122.	28
FIGURA 6	Control negativo (Grupo V). Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2.	28
FIGURA 7	PCRk Grupo I. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122.	29
FIGURA 8	PCRk Grupo II. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122.	29
FIGURA 9	PCRk Grupo III. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122.	30
FIGURA 10	PCRk Grupo IV. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122.	30

FIGURA 11	PCRn Grupo I. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2.	31
FIGURA 12	PCRn Grupo II. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2.	31
FIGURA 13	PCRn Grupo III. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2.	32
FIGURA 14	PCRn Grupo IV. Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2.	32

RESUMEN

En el presente estudio se compararon los partidores kinetoplastídicos (Tc1-Tc2) y nucleares (Tc1-Tc2), en la detección de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en el binomio madre-recién nacido (RN). Se analizó una muestra de 40 madres chagásicas crónicas y sus RN, procedentes de Provincia de Choapa, Región de Coquimbo, de quienes se extrajo sangre periférica en pre-parto y de cordón umbilical al momento del parto, respectivamente. Las madres se seleccionaron según resultados serológicos para enfermedad de Chagas realizados en el primer trimestre del embarazo mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA IgG. Se conformaron grupos de estudio en base a los resultados de PCR kinetoplastídico (PCRk) aplicado a las madres previo al parto y se aplicó PCR con partidores nucleares (PCRn) a la totalidad de madres y RN, con el fin de determinar la utilidad de estos últimos en la pesquisa de *T. cruzi*. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Mc Nemar de muestras asociadas a través del programa SRSS. Se observó que en el 82,5% de las muestras correspondientes a madres con parasitemia positiva o negativa al pre-parto con PCRk, PCRn fue positivo. Considerando sólo las madres negativas a PCRk, PCRn detectó positividad en el 65% de los casos. En los 40 RN en estudio, PCRk fue positivo en el 7,5% de los casos, mientras que PCRn lo fue en el 50%. Dos casos congénitos, confirmados mediante serología convencional antes del año de vida, fueron positivos para ambos partidores (Índice de sensibilidad PCRk y PCRn 100%; índice de especificidad PCRk 100% y PCRn 50%). Estos resultados nos permiten concluir que los partidores nucleares Tc1-Tc2, detectan en el 42,5% de la sangre de cordón de RN, hijos de madres chagásicas, una banda de 166 pb que podría corresponder a trazas de ADN de *T. cruzi*, evidencia que debe ser confirmada por técnicas de secuenciación y/o PCR Tiempo Real. Se concluye además, que la parasitemia materna, no sería un factor relevante en la transmisión congénita de *T. cruzi*, puesto que de 20 madres con parasitemia evidente antes del parto, sólo en dos casos se confirmó la transmisión. En ausencia de diagnóstico parasitológico directo en el RN, la técnica de PCR es una alternativa para el diagnóstico de Chagas congénito, no obstante, este estudio confirma que el estudio serológico posterior a los 8 meses de vida en los hijos de madres chagásicas, es la estrategia más recomendable y factible de llevar a cabo en los centros asistenciales de la zona endémica de nuestro país.

SUMMARY

The present study compared kinetoplastidic (121-122) and nuclear (Tc1-Tc2) primers in the detection of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) in the mother-newborn (NB). We tested a sample of 40 chronic chagasic mothers and their newborns, from Province of Choapa, Region of Coquimbo, from whom peripheral blood was drawn pre-delivery and umbilical cord at delivery, respectively. The mothers were selected according to serologic results for Chagas disease performed in the first trimester of pregnancy by indirect immunofluorescence (IFI) and ELISA IgG. Study groups were formed based on the results of kinetoplastidic PCR (PCRk) administered to the mothers prior to delivery and PCR with nuclear primers (PCRn) it was applied to all mothers and newborns, in order to determine the usefulness of the latter in the inquest of *T. cruzi*. The results were analyzed using McNemar tests of related samples through the program SRSS. It was observed that 82.5% of samples from mothers with positive or negative parasitemia in the pre-partum with PCRk, PCRn was positive. Considering only negative PCRk mothers, PCRn detected positivity in 65% of the cases. In the 40 newborns of the study, PCRk was positive in 7.5% of the cases, while PCRn was in 50%. Two congenital cases, confirmed by serology prior one year of life, were positive for both primers (sensitivity and specificity rates of PCRk 100%; sensitivity and specificity rates of PCRn 100% and 54.1%, respectively). These results allow us to conclude that the nuclear primers Tc1-Tc2, detected in the 42.5% of the cord blood of newborns, children of mothers with Chagas' disease, a band of 166 bp that could correspond to traces of DNA from *T. cruzi*. However, this evidence must be confirmed by sequencing techniques and / or Real Time PCR. It also concludes that the maternal parasitemia would not be a factor in the congenital transmission of *T. cruzi*, since of the 20 mothers with evident parasitemia before delivery in only two cases the transmission was confirmed. In the absence of direct parasitological diagnosis in the NB, the PCR technique is an alternative for the diagnosis of congenital Chagas' disease, however, this study confirms that serological study after 8 months of life in children of mothers with Chagas' disease, is the advisable and feasible strategy to carry out in health centers of endemic areas of our country.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, endémica de Latinoamérica, es una zoonosis parasitaria producida por el protozoo *T. cruzi*. En Chile, afecta áreas rurales y suburbanas en zonas áridas y semiáridas desde la Región de Arica y Parinacota hasta la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, incluida la Región Metropolitana, donde existen tres especies del vector biológico, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*, autóctonos de nuestro país y que participan en el ciclo silvestre y *Triatoma infestans*, que participa en el ciclo doméstico de transmisión. Sin embargo en la actualidad, y gracias al éxito de la “Iniciativa de Cono Sur para la Eliminación de *Triatoma infestans*”, la transmisión vía vectorial no sería tan importante, adquiriendo mayor connotación la transmisión congénita y por transfusión sanguínea.

El curso de la enfermedad de Chagas se manifiesta en tres fases: aguda, con parasitemia intensa, asintomática indeterminada y crónica, caracterizada por una gran disminución de parásitos en circulación. Esta variación en la concentración circulante del parásito hace que los métodos diagnósticos sean aplicados según la etapa de la enfermedad. Así, en la fase aguda los más apropiados son los métodos directos parasitológicos como hemocultivo y el xenodiagnóstico (XD), sin embargo, estas técnicas tienen sensibilidad limitada. Es así como nuevos métodos de biología molecular más sensibles y rápidos, tales como la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), están siendo aplicados en la detección de *T. cruzi*. En la fase crónica en tanto, los exámenes indirectos serológicos como ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), son los más recomendados.

La transmisión congénita de *T. cruzi*, dependiendo del área endémica, representa un 2-10% de niños nacidos de madres infectadas, por lo tanto el diagnóstico de *T. cruzi* en recién nacidos es esencial para la rápida administración de drogas antiparasitarias y para esto es indispensable la utilización de un método directo, sensible y rápido como PCR. Este método se basa en la amplificación y detección de secuencias génicas específicas altamente repetidas del parásito, para lo cual se utilizan partidores específicos para ADN nuclear y ADN kinetoplastídico de *T. cruzi*.

En este estudio se evaluó la utilidad de los partidores nucleares Tc1 y Tc2 en la reacción de PCR aplicada en muestras del binomio madre-recién nacido (RN) para detectar la presencia de *T. cruzi*. Los resultados esperados, en base a los antecedentes disponibles en la literatura, es una mayor sensibilidad en relación a los partidores kinetoplastídicos, habitualmente utilizados en la reacción de PCR.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

i. Antecedentes del agente etiológico

Trypanosoma cruzi, protozoo parásito hemoflagelado perteneciente al Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, endémica desde el sur de los Estados Unidos (42° Lat. N) al sur de Argentina y Chile (43° Lat. S y 34° Lat. S, respectivamente) (Brener *et al.*, 2000).

Trypanosoma cruzi es muy pequeño, mide aproximadamente 20 μm , y posee un cuerpo alargado y provisto de un flagelo y una membrana ondulante, estructuras que, agitándose y vibrando, permiten su movilización dentro de la masa de sangre. Las poblaciones de *T. cruzi* circulan en la naturaleza entre el hombre, el vector y sus múltiples reservorios mamíferos. A lo largo de su ciclo evolutivo sufren profundas alteraciones que reflejan su adaptación al medio en que se localizan. Esas formas reciben nombres diferentes en función de su aspecto general, la manera como el flagelo emerge del cuerpo celular y de la posición relativa de dos importantes estructuras intracelulares: el núcleo y el kinetoplasto (Stoppani y Laghens, 1989).

Las formas infectantes de *T. cruzi* son transmitidas por un proceso contaminatorio vía deposiciones infectadas que el vector elimina al momento de alimentarse. Este mecanismo de transmisión contrasta con aquellas de dos subespecies de trypanosomas africanos que causan enfermedad en humanos, *Trypanosoma brucei gambiense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, los cuales son transmitidos vía saliva del vector (Brener *et al.*, 2000).

Como en otros parásitos que infectan mamíferos e insectos, el ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo. Los epimastigotes corresponden a la forma extracelular no infectante, y se encuentra en el intestino medio de los insectos vectores, donde se multiplican por fisión binaria. En el intestino posterior se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, que son formas no multiplicativas y resistentes al sistema del complemento mamífero, capaces de infectar las células humanas. Ellos ingresan a células locales a través de heridas de la piel, membranas mucosas, o de conjuntiva donde se transforman en amastigotes, los que se multiplican intracelularmente hasta que la célula hospedera colapsa, punto en el que se transforman en tripomastigotes que circularán por el torrente sanguíneo (Kirchhoff, 2009).

Los amastigotes son redondeados y poseen un flagelo externo muy corto o inexistente. El desarrollo de amastigotes a tripomastigotes se inicia después de cumplirse un número preprogramado de divisiones intracelulares, al cabo de las cuales la célula hospedera se destruye y los tripomastigotes entran en el torrente sanguíneo (tripomastigotes sanguíneos).

Trypanosoma cruzi, a diferencia de otros miembros de la familia Trypanosomatidae, posee una única mitocondria, el kinetoplasto, la cual se extiende a través de la célula (Degraeve *et al.*, 1988). Los tripomastigotes encontrados en la sangre circulante, tienen un tamaño total que varía entre 15 y 20 μm , tienen flagelo libre, un kinetoplasto voluminoso, terminal o subterminal, y un núcleo oval. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular (Stoppani y Laghens, 1989).

El ADN kinetoplastídico representa entre el 20-25% del ADN total del parásito y consiste en una red de moléculas circulares, maxicírculos (25-50 copias por célula) y minicírculos (20.000-30.000 copias por célula) (Degraeve *et al.*, 1988). Experimentos de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) con minicírculos de ADN han revelado un gran polimorfismo en estas moléculas (Morel *et al.*, 1980), relacionado con una gran diversidad isoenzimática (Tibayrenc y Ayala, 1988). La secuenciación de algunos minicírculos demostró que la secuencia (1.440 pb) está organizada en cuatro regiones equidistantes de 100 pb con secuencias altamente similares y un número equivalente de regiones hipervariables. Cada secuencia variable de un minicírculo dado parece ser único (Degraeve *et al.*, 1988).

Mediante técnicas electroforéticas e isoenzimáticas, se han podido identificar varios zimodemas con características biológicas y patológicas particulares, que le dan un carácter propio a la enfermedad de Chagas en las diferentes regiones donde es prevalente. Un zimodema incluye todos los parásitos que muestran patrones idénticos para un grupo de enzimas. De igual forma, el análisis de ADN ha podido revelar la existencia de esquizodemas que, al igual que los zimodemas, se pueden asociar con comportamientos biológicos particulares de los parásitos. Mediante la investigación de características biológicas como la virulencia, la evolución de la parasitemia, el histotropismo y las formas celulares predominantes, se pueden diferenciar hasta tres grandes grupos de cepas de *T. cruzi* denominados biodemas. Diferentes grupos de investigadores han reportado una estrecha correlación entre zimodemas y esquizodemas, sugiriendo que los genes estructurales nucleares que codifican enzimas y el ADN extranuclear (ADNk) han tenido una evolución paralela (Montamat *et al.*, 1999).

La biología, bioquímica y diversidad genética de las cepas de *T. cruzi* han sido ampliamente reconocidas, además de su complejidad eco-epidemiológica, estudiada extensivamente en diferentes partes del mundo (Campbell *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2009). A lo largo de años se han utilizado diversas aproximaciones para caracterizar la estructura de las

poblaciones de *T. cruzi*, con el fin de determinar el número de subgrupos relevantes. En la Second Satellite Meeting del año 1999 (Zingales *et al.*, 2009), en un esfuerzo por unificar la nomenclatura de *T. cruzi*, se alcanzó el consenso de que las cepas de *T. cruzi* deben ser referidas según seis DTU (*Discrete Typification Unit*), *T. cruzi* I-VI. Los DTU se definen como “conjunto de poblaciones que están genéticamente más relacionadas la una con la otra, más que con otras poblaciones y que son identificables por genética común, marcadores moleculares o marcadores inmunológicos” (Tibayrenc, 1998). Los 6 DTU revelados por la genotipificación multilocus, provienen de 2 grandes subdivisiones llamadas DTU I y DTU II. El DTU II fue subdividido en 5 DTUs, IIa-e (Brisse *et al.*, 2001), basado en la información filogenética congruente obtenida por marcadores MLEE (Multi-Locus Enzyme Electrophoresis) y RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA).

Los DTUs I y IIb corresponden, respectivamente, a los grupos *T. cruzi* I (TcI) y *T. cruzi* II (TcII), recomendados por el comité experto original en 1999. DTU I (TcI) y DTU IIb (TcII), fueron determinados en base a sus características isoenzimáticas. TcI circula en el ciclo silvestre y en casos humanos del altiplano chileno-boliviano y algunos casos de Venezuela. TcII corresponde al ciclo doméstico (Apt *et al.*, 2008). TcI predomina en el norte del Amazonas teniendo como hospederos naturales a especies de *Didelphis*, mientras que armadillos hospedan el linaje TcII, el cual predomina en el Cono Sur de América. Ambos linajes pueden infectar humanos, y aunque el sub-linaje TcIIId esta predominantemente en circulación en los países del Cono Sur, en Chile y Bolivia principalmente, se han reportado infecciones mixtas con TcI (clonete 20) y TcIIId (clonete 39) (Virreira *et al.*, 2006a).

Debido a la gran heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi*, algunos trabajos han abierto la posibilidad de considerar un comportamiento diferente entre los clones constitutivos con respecto a su cepa parental (Apt *et al.*, 2008).

ii. Antecedentes epidemiológicos

Actualmente, la infección se encuentra en forma natural en el continente americano, desde el sur de California, Estados Unidos, en el paralelo 43 latitud norte, hasta el paralelo 49 de latitud sur en Latinoamérica, región central de Argentina, zona donde habita el vector biológico. En América afecta a 17 países, con aproximadamente 10 millones de personas infectadas, procedentes de áreas urbanas y peri-urbanas (Apt *et al.*, 2008). Así mismo, Tarleton *et al.* (2007),

estimaron que el número de personas infectadas en el continente americano es de 7-15 millones y que al año se originan entre 50.000 a 200.000 nuevas infecciones.

Desde el año 1990, la World Health Organization (WHO, 2000) y la WHO Regional Office for the Americas/Pan American Health Organization (PAHO, 1994), en cooperación con las autoridades regionales y nacionales, han llevado a cabo en varias regiones de América, una serie de campañas de control y de eliminación de la enfermedad de Chagas, en relación a los diferentes patrones de transmisión, características epidemiológicas y las manifestaciones clínicas características de Chagas en cada región. Estas intervenciones han contribuido a la interrupción de la transmisión en amplias áreas. Brasil, Chile y Uruguay se han declarado libres de la transmisión de la enfermedad Chagas causada por *Triatoma infestans*, el principal vector domiciliario en estos países. Según la información de 21 países donde la enfermedad es endémica, hoy se estima un número de infectados de 7.694.500; esto representa una reducción del 50% respecto de la tasa de infección del año 1990 (Guhl, 2007).

En Chile el área endémica se extiende desde las regiones de Arica-Parinacota y Tarapacá a la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana. La infección chagásica ha sido detectada en áreas rurales y suburbanas de Chile, entre 18°30' Lat. S y 34°16' Lat. S, correspondientes a las zonas áridas y semiáridas. En el año 2005 se estimó que en Chile, 142.000 personas estaban infectadas y 1.000.000 en riesgo de infección (Rozas *et al.*, 2005). El año 2008 Apt *et al.*, señalaron que los habitantes en riesgo serían aproximadamente 850.000 personas, de áreas rurales y peri-urbanas. Investigaciones realizadas en zonas endémicas establecieron, hace dos décadas atrás, prevalencias del 16,7% en sectores rurales periurbanos y de 1,9% en los sectores urbanos (Schenone *et al.*, 1995).

En Chile existen tres vectores biológicos, *T. infestans* que participa en el ciclo doméstico de transmisión, *M. spinolai* en el ciclo silvestre, éste último, autóctono de nuestro país y *M. gajardoi*, que se encuentra en áreas costeras del norte de Chile y en el que se ha confirmado recientemente la infección por *T. cruzi* (Botto-Mahan *et al.*, 2008). En el ciclo doméstico, el principal vector de enfermedad de Chagas humana es *T. infestans*, vector que en nuestro país ha sido reducido en forma importante por medio de periódicas fumigaciones en viviendas y hábitats peridomésticos de áreas endémicas, según la "Iniciativa de Cono Sur para la Eliminación de *T. infestans*". *M. spinolai* es un vector endémico de Chile que vive en hábitats silvestres y peridomésticos como madrigueras de roedores silvestres, gallineros y corrales de cabras. Se alimenta de animales silvestres, sin embargo, puede acercarse a poblaciones humanas para alimentarse de animales peri domésticos y seres humanos (Rozas *et al.*, 2005). Se han encontrado

animales de producción infectados con *T. cruzi*, pero no se sabe si el parásito afecta la salud de estos. Aves, anfibios y reptiles son naturalmente resistentes a la infección de *T. cruzi*, sin embargo, en algunas situaciones, las aves pueden ser importantes fuentes de sangre para alimentación de triatominos (Kirchhoff, 2009).

Los parásitos son transmitidos a través de las deposiciones que el vector elimina en el momento de alimentarse. La enfermedad de Chagas es adquirida a través de insectos hematófagos de la familia Reduviidae, pero también por otros mecanismos como transfusiones sanguíneas y transmisión congénita (Virreira *et al.*, 2006b). Este tipo de transmisión permite que la enfermedad, que es principalmente rural, se traslade a zonas urbanas, e incluso a países en los que no se encuentra el vector, a través de la migración de personas infectadas, ya que, si bien no hay traslado del vector, son las mujeres embarazadas portadoras de la enfermedad las que pueden transmitir el parásito por vía vertical o transplacentaria a su hijo (Cusnaider *et al.*, 2004), ya sea en etapa aguda o crónica de la enfermedad. Se estima que ésta constituye entre el 2%-10% de los casos seropositivos en la infancia y adolescencia, mientras que el 60% de los recién nacidos (RN) hijos de madres chagásicas son seropositivos, debido al traspaso de anticuerpos pasivos maternos, los cuales se negativizarían antes del año de edad (Apt *et al.*, 2008). Cusnaider *et al.* (2004) señalan que de todas las gestantes, un 3 a 17% son seropositivas para Chagas, incluso hay publicaciones que hablan de un rango mayor del 2 a 51%. De este porcentaje entre el 0,7 y 10% de hijos de madres infectadas presentarán Chagas congénito. Los autores sugieren que la transmisión dependería del nivel de parasitemia e inmunidad materna; es decir, madres con inmunosupresión poseerían mayor riesgo de transmisión. Por otra parte, Gürtler *et al.* (2003), señalan además, que existe subnotificación de casos de Chagas congénito, por lo que hay que multiplicar por 6 ó por 10 para estimar el número de casos reales. En Argentina por ejemplo, se notifican 142 casos anuales.

La infección por *T. cruzi* es además potencialmente transmisible por transfusión sanguínea, por lo cual debe ser estudiada en zonas donde existan potenciales donantes infectados. Actualmente en Chile el “screening” para *T. cruzi* es la mayor fuente de identificación de infectados, por lo que es obligatorio en Bancos de Sangre de entre las regiones de Arica y Parinacota y la región del Libertador General Bernardo O’Higgins; sin embargo, esto no asegura que en el resto del país no existan donantes chagásicos, dada la migración rural urbana y de norte a sur dentro del país. La prevalencia de donantes confirmados por el Laboratorio de Referencia del Instituto de Salud Pública entre los años 2000-2005 osciló entre 0,5-1,6% (Apt *et al.*, 2010). Finalmente, se ha comprobado la transmisión de *T. cruzi* por vía oral, como lo evidencia

Rodrigues (2007), señalando que *T. cruzi* puede también transmitirse por el consumo de alimentos contaminados con deyecciones de triatominos.

En Chile existe vigilancia epidemiológica pasiva de la enfermedad de Chagas y se asume que hay una sub-notificación. Si bien las tasas de morbilidad han descendido en este último tiempo, ha habido periodos de ascenso de ella desde una tasa de 3,22 el año 1994 a 5,21 el año 2000; posteriormente se ha evidenciado un descenso sostenido. Los indicadores oficiales de morbilidad han sido estables en los últimos años, y representan la infección adquirida décadas atrás, 80% cardiopatías chagásicas, 93% de las cuales corresponden a personas sobre 45 años de edad. Desde 1989 no se registran muertes bajo los 15 años de edad. Casi el 56% de los casos corresponden al Servicio de Salud de Coquimbo (Apt *et al.*, 2010).

iii. Enfermedad de Chagas

Los parásitos depositados en heridas de piel o en mucosas estimulan una reacción inflamatoria local (chagoma) con una respuesta linforeticular. Los tripomastigotes en circulación son fagocitados por macrófagos y parasitan hígado, bazo, ganglios linfáticos, músculo esquelético y cardíaco para formar pseudoquistes (nidos) de amastigotes. Con la ruptura de los pseudoquistes en el miocardio o plexos mesentéricos se origina miocarditis aguda mediada por células TCD4+ y TCD8+ e interleukinas (principalmente IL-1 e IL-2). La reacción inflamatoria lleva a destrucción de células musculares y neuronales, lo que es mantenida por la presencia de *T. cruzi* o sus fragmentos y por el ADN del parásito, con una reacción de hipersensibilidad tardía, dilatación de la microcirculación y fibrosis, de esta manera induce miocardiopatía dilatada crónica, arritmia, disperistalsis, megaesófago y megacolon (Rodrigues, 2007).

La infección tiene tres fases: fase aguda que dura de 2 a 4 meses con parasitemias donde sólo un 10% de los individuos presenta compromiso clínico; fase indeterminada o latente (asintomática) que dura de 10 a 20 años, donde el parásito está en los tejidos con parasitemias transitorias; y el 30% pasará a una fase crónica o sintomática, donde por posible acción de autoanticuerpos hay afección en grado variable de diversos órganos y sistemas, especialmente del corazón, tubo digestivo y sistema nervioso (Cusnider *et al.*, 2004). Después del desarrollo de la fase aguda de enfermedad, caracterizada por parasitismo intenso y generalmente síntomas como fiebre y lesiones miocárdicas, se desarrolla la fase asintomática indeterminada con parasitemia subpatente y serología positiva (Flores-Chávez *et al.*, 2006).

Desde que en el año 1911 se postulara la transmisión transplacentaria en la enfermedad de Chagas, numerosos autores lo han confirmado experimentalmente y en la práctica clínica (Muñoz *et al.*, 1992). En Chile las primeras demostraciones corresponden a Howard (1962), quién en un centro de prematuros de Santiago, encontró 0,5% de enfermedad de Chagas congénita en niños que pesaban menos de 2.000 gramos. En el caso de las infecciones congénitas, la madre infectada puede transmitir el parásito en la etapa aguda o crónica de su enfermedad, esté habitando o no en zona endémica. Se desconocen aún los factores que condicionan la infección transplacentaria, debido a que no todos los hijos de madres chagásicas adquieren la infección, por ejemplo, la incidencia de Chagas congénito varía de 2,1 a 28,2% en Chile, de 0,5 a 10,4% en Argentina, de 0,5 a 4,0% en Uruguay y de 10% en Paraguay. Sin embargo, se ha comprobado que las embarazadas chagásicas presentan una mayor frecuencia de xenodiagnósticos positivos y un cuadro serológico sugestivo de reactivación que permite deducir un aumento de la frecuencia y los niveles de parasitemia, siendo esta más acentuada en el tercer trimestre lo que favorecería la transmisión transplacentaria. Las lesiones placentarias son diversas y van de escasos infiltrados inflamatorios agudos y/o crónicos con presencia de nidos de amastigotes, a presentar áreas de necrosis, granulomas con células gigantes, parasitismo de células trofoblásticas, vellositis e intervallositis. El RN puede presentar la enfermedad de Chagas que se manifiesta con una placenta sin parásitos o a la inversa. Los parásitos se presentan en una mayor proporción en los fibroblastos coriónicos y en el mesénquima sub-amniótico del sinus marginal donde las membranas se unen al corion (Mollinedo *et al.*, 2005).

El 80% de los recién nacidos son asintomáticos u oligosintomáticos, y el 20% son sintomáticos, presentando la siguiente clínica: prematuridad, aborto, crecimiento intrauterino retardado (CIR), mortinato, cuadro pseudogripal o síndrome febril prolongado, hepatoesplenomegalia, ictericia, taquicardia persistente; menos frecuentes se presentan hipotonía muscular, linfadenomegalias, edema, sepsis, anemia, plaquetopenia, leucocitosis, meningoencefalitis con convulsiones y miocarditis aguda. El riesgo de mortalidad es bajo (5%), asociado con producción sistémica y placentaria de factor de necrosis tumoral (Cusnaider *et al.*, 2004). Los casos sintomáticos tienen diferencias clínicas, serológicas y parasitológicas que pueden atribuirse a infecciones precoces o tardías en la vida intrauterina, pero también a la respuesta inmunológica del niño, duración del estímulo antigénico y la virulencia de la cepa; estos factores condicionan manifestaciones clínicas tan variables como niños prematuros con importante morbilidad y elevada mortalidad a niños a término con un solo signo o síntoma, por ejemplo la presencia de fiebre (Mollinedo *et al.*, 2005).

En áreas no endémicas, se suelen observar casos de Chagas congénito de segunda generación, en los que la abuela es procedente de área endémica, la hija nacida en área no endémica, sin antecedentes migratorios o de transfusión, y el hijo positivo (Mollinedo *et al.*, 2005).

En Chile se considera un caso sospechoso agudo, a aquel paciente con fiebre sin otra explicación y/o hepato-esplenomegalia y/o chagoma de inoculación, que además reside en una zona endémica o tiene antecedentes de haber estado en dicha zona en los últimos 6 meses, o ha tenido contacto con sangre de terceros a través de transfusiones, uso de drogas intravenosas o accidentes laborales u otro material biológico. El caso confirmado se considera a aquel paciente que presenta clínica compatible y que fue además confirmado por la positividad de dos técnicas serológicas convencionales para *T. cruzi* (Apt *et al.*, 2008).

Las drogas actualmente en uso, el nifurtimox y benznidazol, son eficaces cuando se les aplica a los niños en forma precoz. En los adultos la eficacia de la terapia es variable, dependiendo muchas veces de la resistencia de la cepa de *T. cruzi* a la droga. Actualmente la OMS sugiere que estos fármacos son efectivos sólo en el período agudo y temprano crónico (crónico inicial) de la enfermedad (WHO, 2000).

iv. Diagnóstico

Al inicio de la infección, es decir en la etapa aguda, las parasitemias son importantes, por lo que los estudios van a centrarse en la búsqueda del agente mediante estudios parasitológicos directos, mientras que en etapas latente y crónica, debido a los bajos y nulos niveles de parasitemia, el diagnóstico se realiza fundamentalmente por métodos serológicos (Cusnider *et al.*, 2004), como ELISA e inmunofluorescencia indirecta. Generalmente estos ensayos son bastante sensibles, pero la ocurrencia de falsos positivos ha sido un problema persistente.

La fase crónica de la enfermedad de Chagas se caracteriza por una gran reducción en el número de parásitos circulantes, haciendo la detección visual de *T. cruzi* ineficiente para el diagnóstico. Algunos métodos de amplificación de parásitos han sido desarrollados para resolver este problema, como xenodiagnóstico y hemocultivo, pero éstos tienen dos restricciones principales: sus sensibilidades son bajas, y están lejos de ser simples. El uso de xenodiagnóstico (XD) implica la mantención de una gran colonia de triatominos no infectados. Su sensibilidad depende de la especie de triatomino utilizada, el número de insectos usados y el tiempo de

examinación posterior a la alimentación. Es un procedimiento sofisticado que utiliza el vector, obtenido de cultivo biológico, para la detección de la infección de *T. cruzi* en el hombre y otros mamíferos. En el XD, se usan ninfas de triatominos criadas en laboratorio que son alimentadas con gallinas, refractarias al parásito. El XD, se realiza mediante el uso de una cajita cilíndrica de madera o material similar que lo reemplace, cubierto por una pieza de gasa, contiene 7 a 10 ninfas de tercer estadio, soportado por un brazalete, y es aplicado durante 20 a 30 minutos sobre la superficie de la piel de los miembros superiores de los individuos a examinar. Luego de este tiempo, las ninfas son mantenidas bajo condiciones de laboratorio. Luego de 30 días, las deyecciones (fecas y orina) de los insectos son examinadas microscópicamente en busca de formas tripomastigotas móviles de *T. cruzi*. El XD presenta una mayor sensibilidad en individuos jóvenes y con infección reciente. De esta manera, se han reportado sensibilidades en grupos etarios menores de 10 años del 60,8% y 75%. En la infección crónica, en cambio, se ha reportado una sensibilidad de 49,3%. (Schenone *et al.*, 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). Adicionalmente, provoca reacciones alérgicas en muchos pacientes y además no es recomendada para niños pequeños.

Por otra parte, el hemocultivo requiere el empleo de gran cantidad de sangre, en general de 30 ml, acondicionada en red de frío, con procesamiento inmediato de la muestra, que es sometida a centrifugación para la obtención del plasma que contiene los anticuerpos del paciente, en general deletéreos para el *T. cruzi* (Basso *et al.*, 1984). La siembra se hace habitualmente con medio LIT (infusión de hígado y triptosa) de preparación compleja. Se siembran varios tubos que se examinan cada mes, hasta completar 5 a 6 meses (Castro *et al.*, 2002). Además requiere condiciones de esterilidad para la manipulación de las muestras, lo cual es difícil de conseguir en áreas rurales pobres donde la enfermedad de Chagas es endémica (Junqueira *et al.*, 1996).

Es así que ha surgido el interés de contar con un método directo y sensible para el diagnóstico de enfermedad de Chagas como es el PCR, el cual se ha propuesto como una buena herramienta alternativa para la detección de *T. cruzi* en sangre humana (Gomes *et al.*, 1999).

- **PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas**

La reacción de la polimerasa en cadena (PCR), es una técnica que se fundamenta en la detección y multiplicación de minicírculos de ADN kinetoplástico (ADNk) de *T. cruzi*, con altos porcentajes de sensibilidad (Junqueira *et al.*, 1996). Además, la detección por PCR de ADNk de

T. cruzi y amplificación de segmentos de ADN, son de valor como marcadores moleculares para definir genotipos parasitarios circulantes en la naturaleza (Solari *et al.*, 2001).

El genoma de *T. cruzi* está en dos compartimentos celulares bien definidos. Uno es el núcleo, que contiene el ADN nuclear (ADNn) y mitocondrias que contienen el segundo compartimento llamado kinetoplasto, donde se encuentra el ADNk, el cual representa cerca del 20% del ADN total del parásito y está formado por minicírculos (1,4 kpb) y maxicírculos (1,6 kpb) de ADN encadenados formando una red compacta. Cada minicírculo presenta cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre sí y con un tamaño cercano a los 120 pb y representan los orígenes de la replicación de los minicírculos, además contiene cuatro regiones hipervariables en secuencias de tamaño cercano a 250 pb (Brener, 1985). Ambos tipos de ADN (ADNn y ADNk) contienen muchas secuencias repetidas que son altamente apropiadas para detección por PCR. Los 195 y 166 pb satélite repetidas en ADNn es el blanco para los partidores Tcz1/Tcz2 (o Diaz1/Diaz2) y los partidores TC1/TC2, respectivamente, los cuales no amplifican ADN de otro *Trypanosoma* o *Leishmania*. El dominio conservado de minicírculos de ADNk es el blanco en la reacción de PCR. Algunos partidores usados son S35/S36, TC1/TC2, CV1/CV2 y 121-122, los que utilizan un fragmento de 330 pb de los minicírculos de ADNk (Virreira *et al.*, 2003).

PCR ha sido exitosamente aplicada en el estudio de la transmisión vertical de *T. cruzi*, la que dependiendo, entre otros factores, de la parasitemia de la madre, la cepa infectante y de las modalidades técnicas de la pesquisa del parásito, describen cifras que fluctúan entre el 2-10% de positividad en los recién nacidos, hijos de madres infectadas. El diagnóstico de *T. cruzi* en recién nacidos es esencial para la rápida administración de drogas antiparasitarias (Virreira *et al.*, 2003).

Al respecto, Virreira *et al.* (2003), demuestran que la detección directa de *T. cruzi* a través de PCR utilizando partidores nucleares, tiene una sensibilidad suficiente para su aplicación diagnóstica, incluso detectando un parásito en un volumen razonable de sangre (0,1 mL). Tal sensibilidad debería ser suficiente para detectar infecciones congénitas que corresponden a una fase de parasitemia aguda. Un estudio realizado por Moser *et al.* (1989), demostraron que la amplificación de los 195-pb de *T. cruzi* es un método altamente sensible para detectar pequeños números de parásitos, y en su estudio detectaron cantidades tan pequeñas como 8 organismos en 100 µL de muestras de sangre de ratones y humanos. Este nivel de sensibilidad es considerado mayor que el obtenido en estudios previos en que se detectaron 67 y 80 parásitos (Gonzalez *et al.*, 1984; Ashall *et al.*, 1988) por métodos que no incluían amplificación de ADN parasitario.

Según algunos autores el uso de PCR para la detección de *T. cruzi* no estaría justificado, debido al alto costo y la necesidad de personal entrenado, siendo de momento una técnica para centros de investigación, sin embargo, es importante porque puede detectar ADN parasitario en cualquiera de las etapas de la enfermedad, además es un excelente método para seguimiento postratamiento del Chagas congénito, pareciendo ser mejor en este sentido que la serología. También se ha utilizado PCR para diagnóstico prenatal buscando ADN parasitario en líquido amniótico de mujeres embarazadas con serología positiva para esta enfermedad (Gomes *et al.*, 1999; Cusnaider *et al.*, 2004).

Para cualquier enfermedad un diagnóstico pronto y certero es de necesidad para la aplicación del tratamiento. En el caso de la enfermedad de Chagas, el no diagnosticar un RN se traduce en la progresión de la infección de una fase aguda sintomática o asintomática con parasitemia, que puede durar de 2 a 4 meses, a una fase indeterminada asintomática que dura años, y luego en el 30% de los casos pasa a una fase crónica a los 40-60 años de edad, que es cuando se produce la clínica de deterioro orgánico con miocardiopatías, megaesófago y megacolon, principalmente. Por ello es importante el diagnóstico precoz perinatal de Chagas congénito y la aplicación de un inmediato tratamiento, evitando el paso a estas fases de la enfermedad (Cusnaider *et al.*, 2004).

En Chile, no existen normas oficiales para el estudio de la transmisión vertical de *T. cruzi* y el diagnóstico de la infección congénita representa un desafío y una tarea pendiente.

En este estudio, se propone evaluar dos partidores de *T. cruzi*, con el fin de determinar y comparar el rendimiento de ambos y de esta forma, optimizar la reacción de PCR para la detección de *T. cruzi* en los casos congénitos, minimizando los casos falsos negativos que podrían eventualmente evolucionar a la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

III. HIPÓTESIS

La técnica de la PCR, para la detección de *T. cruzi* en sangre de madres chagásicas crónicas y sus recién nacidos, es más sensible al utilizar los partidores nucleares Tc1-Tc2, en comparación con los partidores kinetoplastídicos 121-122.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar, mediante PCR, la sensibilidad y especificidad de partidores nucleares en la detección de *T. cruzi* en madres chagásicas y sus RN, en comparación a los resultados de PCR con partidores kinetoplastídicos y serología convencional.

V. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aplicar PCR con los partidores nucleares Tc1-Tc2, en muestras de sangre periférica de madres chagásicas con resultados de PCR positivo y negativo con ADNk de *T. cruzi*.
- Aplicar PCR con los partidores nucleares Tc1-Tc2, en muestras de sangre de recién nacidos con resultados de PCR positivo o negativo con ADNk de *T. cruzi*.
- Comparar los resultados obtenidos por la utilización de ambos partidores de PCR en los binomios madre-RN.
- Correlacionar, en los RN, los resultados de PCR obtenidos y la serología convencional posterior a los 8 meses de vida.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

i. Grupo de estudio

Se evaluaron muestras biológicas obtenidas de 40 madres chagásicas crónicas y sus 40 recién nacidos procedentes de la Provincia de Choapa, Región de Coquimbo, cuyo parto ocurrió entre los años 2006-2007. Además se utilizaron las muestras de 7 binomios madre-hijo no infectados, como grupo control. Todas las madres aceptaron desde su inicio participar en el estudio de “Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi*”, bajo Consentimiento Informado aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

ii. Obtención de las muestras biológicas

Las muestras de sangre periférica de las madres fueron tomadas en condiciones de pre-parto mediante punción venosa, y al igual que la sangre de cordón de los RN, fueron recibidas en tubos Venoject que contenían igual volumen de solución guanidina-HCl 6 M y EDTA 0,2 M (preservante y anticoagulante, respectivamente). Para la reacción de PCR, todas las muestras se incubaron a 98° C por 15 min, para favorecer el desencadenamiento de la red de minicírculos de *T. cruzi* y se conservaron a -20° C. Posteriormente, se realizó la extracción y purificación del ADN de todas las muestras en estudio, mediante el kit FAVORGEN de BIOTECH CORP, las cuales se conservaron a -20° C y que corresponden a las muestras biológicas utilizadas en el presente estudio.

iii. Clasificación de las muestras en estudio

Las muestras fueron seleccionadas según los resultados de los exámenes serológicos realizados, incluyendo en el estudio aquellas muestras de madres con IFI y ELISA IgG positivos al momento del parto y sus respectivos hijos. Sobre las muestras de ADN extraído de las madres se realizó PCRk, resultados que permitieron separar las muestras en dos grupos: madres positivas y madres negativas a PCRk, y dos grupos correspondientes a sus respectivos RN.

La conformación de los grupos de las muestras en estudio, que fueron clasificadas de acuerdo a información previa de resultados de PCR con los partidores kinetoplastídicos (121-122), se detalla a continuación:

- ❖ **Grupo I:** 20 madres chagásicas con PCRk negativo.
- ❖ **Grupo II:** 20 RN hijos de las madres del Grupo I.

- ❖ **Grupo III:** 20 madres chagásicas con PCRk positivo.
- ❖ **Grupo IV:** 20 RN hijos de las madres del Grupo III.
- ❖ **Grupo V:** 7 binomios madre-RN no infectados.

Todas las mujeres pertenecientes a los Grupos I y III, habían sido además diagnosticadas como positivas para la infección con *T. cruzi* durante su control de embarazo, condición determinada mediante técnicas de serología convencional (ELISA e IFI IgG).

Todos los RN tuvieron al menos un seguimiento serológico (ELISA e IFI IgG) y parasitológico (PCR) al año de vida.

El control negativo se utilizó con el fin de evaluar las técnicas de PCR, tanto de PCRk como de PCRn. Las muestras que conformaron el Grupo V del estudio fueron obtenidas de binomios madre-hijo no infectados. La condición de no infectados se confirmó mediante test serológicos, xenodiagnóstico y PCRk y PCRn. Las muestras por grupo se detallan en el Anexo.

iv. Extracción del ADN con kit Favorgen ® de BIOTECH CORP.

a. Lisis Celular

En un tubo Eppendorf se agregó 200 µL de la muestra de sangre (previamente hervida a 100° C por 15 minutos), y se adicionó 20 µL de proteinasa K y 200 µL de buffer FABG. Luego se homogeneizó en vortex, e incubó a 60° C por 15 minutos. Se removieron los residuos de la tapa, por breve agitación del tubo.

b. Unión

Se adicionó 200 µL de etanol (96-100%) a la muestra y se homogeneizó por agitación con vortex. Luego se agitó brevemente el tubo para remover los residuos en la tapa y en un tubo de recolección nuevo se colocó una columna FABG y se transfirió la mezcla, incluyendo cualquier sedimento. Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 13.000 g y se descartó el sobrenadante.

c. Lavado

La columna FABG se lavó con 500 µL de buffer W1 mediante centrifugación por dos minutos, y se descartó el sobrenadante. Posteriormente la columna FABG se lavó con 750 µL de buffer Wash mediante centrifugación por dos minutos y se descartó el sobrenadante. Luego se

centrifugó por 3 minutos adicionales para secar la columna, evitando el líquido residual que podría inhibir subsiguientes reacciones enzimáticas.

d. Elución

Se colocó la columna FABG en un tubo de elución, se adicionó 200 µL de buffer de elución o H₂Odd (pH 7,5-9,0) al centro de la membrana de la columna FABG y se mantuvo por 2 minutos. Se centrifugó la elución que contenía los fragmentos de ADN por 2 minutos.

e. Conservación

Las muestras de ADN purificado fueron guardadas selladas en un congelador a -20° C.

v. PCR con partidores ADNk-*T. cruzi*

Se desarrolló de acuerdo a la técnica descrita por Solari *et al.* (2001) y Zulantay *et al.* (2004), estandarizada para los reactivos a disposición. Para pesquisar la banda de 330 pb, la mezcla estuvo compuesta por 5 µL de la muestra de ADN purificada, 2 µL de los oligonucleótidos 121 (5'-AAATAATGTACGGG (T/G) GAGATGCATGA3') y 122 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'), a una concentración de 25 µM, 4 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), 0,4 µL (0.4 mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a una concentración de 25 mM, 6,4 µL de agua bidestilada para un volumen final de 20 µL, además de 1 U Taq polimerasa (0,2 µL). La reacción de PCRk se compone de dos ciclos iniciales, uno a 98° C por 1 minuto y otro a 64° C por 2 minutos; 33 ciclos intermediarios a 94° C por 1 minuto, 64° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto; un ciclo final de 72° C por 10 minutos, y mantención a 4° C. La prueba se realizó en un termociclador TC-412, Techne. Luego, 10 µL de cada amplificado se cargó en un gel de agarosa al 2% en buffer Tris Borato EDTA 1x, más 13 µL de Bromuro de Etidio. Se sometió a electroforesis de 113 volts, durante 45 minutos, sumergido en buffer para electroforesis Tris Borato EDTA 1x. Se utilizó como control marcador Ladder de 100 pb. El gel fue fotografiado al término del proceso.

Los reactivos y protocolo utilizado para la técnica de PCRk se señalan en la Tabla 1:

Tabla 1: Concentraciones de reactivos utilizados en la preparación del Mix de PCR, según la técnica descrita por Solari *et al.*, 2001 y Zulantay *et al.*, 2004.

REACTIVOS	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION DE TRABAJO	CONCENTRACION EN MIX	MUESTRA
Buffer GoTaq (Promega)	5 x	5x	2x	4 µL
MgCl ₂	25 mM		2.5 mM	2 µL
dNTPs	100 mM	25 mM	0.2 mM	0.4 µL
Primer 121 50 pmol/µL	100 µM	25 µM	0.5 µM	1 µL
Primer 122 50 pmol/µL	100 µM	25 µM	0.5 µM	1 µL
Taq DNA Polymerase Platinum 5 U/µL (Invitrogen)	5 U/µL	5 U/µL	1 U	0.2 µL
Bi distilled or MQ water				6.4 µL
Muestra				5 µL
Volumen Final				20 µL

El programa de amplificación en el termociclador se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2: Especificación de temperaturas y tiempos por ciclo del programa de amplificación de ADN en termociclador utilizando partidores kinetoplastídicos (121-122).

TEMPERATURA	TIEMPO
2 CICLOS	
98° C	1 MIN
64° C	2 MIN
33 CICLOS	
94° C	1 MIN
64° C	1 MIN
72° C	1 MIN
EXTENSIÓN	
72° C	10 MIN
MANTENCIÓN	
4° C	

vi. PCR con partidores ADNn-*T. cruzi*

Se desarrolló de acuerdo a la técnica descrita por Schijman (2008). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µl de la muestra purificada de ADN, 1.5 µl del oligonucleótido Tc1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3') y 1.5 µL del oligonucleótido Tc2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') a una concentración de 10 µM (concentración final de 0,5 µM), 0.12 µl de Taq polimerasa (1 U), 6 µL de Buffer Taq polimerasa (1x), 3.6 µL de MgCl₂ (concentración final 2.5 mM), 0.3 µL del mix de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (concentración final 0.2 mM de cada nucleótido), 11.98 µL de agua bidestilada libre de nucleasas para un volumen final de 30 µl. La reacción de PCR se realizó en un termociclador TC-412, Techne. La reacción de PCR se compone de una desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificación a 94° C por 1 minuto, 68° C por 30 segundos y 72° C por 1 minuto, y mantención a 4° C. Las condiciones de electroforesis fueron semejantes a las descritas para la reacción de PCR para detectar ADNk de *T. cruzi*, con la diferencia que en este caso se consideró una reacción positiva para PCR la aparición de una banda de 166 pb correspondiente a ADNn de *T. cruzi*.

vii. Estandarización de la técnica PCR nuclear

Previo a la aplicación del método de PCR nuclear sobre las muestras de ADN extraído, se realizaron 4 pruebas de la técnica sobre 2 muestras de ADN positivas a *T. cruzi* (que luego de la Prueba 1 se aumentó a 3), obtenidas de la sangre de madres infectadas, infección determinada por IFI, ELISA y PCR kinetoplástico, y sobre 2 muestras negativas a *T. cruzi*, obtenida de dos madres no infectadas, pertenecientes al grupo control negativo (Grupo V), además de un control positivo y uno negativo, con el fin de establecer las mejores concentraciones de reactivos de acuerdo a las condiciones del laboratorio y de los reactivos a disposición. Los resultados esperados en estas pruebas eran la correlación de los resultados con la información previa de las muestras utilizadas, es decir, positividad en las muestras positivas, y negatividad en aquellas muestras negativas.

a. Prueba 1

En esta prueba se utilizó un protocolo basado en el descrito por Schijman (2008). El protocolo se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3: Protocolo de Mix para PCR nuclear descrito por Schijman (2008).

REACTIVOS	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION DE TRABAJO	CONCENTRACION EN MIX	MUESTRA
Buffer GoTaq (Promega)	5x	5x	1x	6 µL
MgCl ₂	25 mM			3.6 µL
dNTPs	100 mM	25 mM	0.25 mM	0.3 µL
Primer Cruzei 1 50 pmol/µL	100 µM	10 µM	0.5 µM	1.5 µL
Primer Cruzei 2 50 pmol/µL	100 µM	10 µM	0.5 µM	1.5 µL
Taq DNA Polymerase Platinum 5 U/µL (Invitrogen)	5 U/µL	5 U/µL	0.6 U	0.12 µL
Bi distilled or MQ water				11.98 µL
Muestra		25 µL		5 µL
Volumen Final		30 µL		30 µL

El programa de amplificación en el termociclador se muestra en el Tabla 4:

Tabla 4: Especificación de temperaturas y tiempos por ciclo del programa de amplificación de DNA en termociclador utilizando partidores nucleares (Tc1-Tc2).

TEMPERATURA	TIEMPO
94° C	5 MIN
40 CICLOS	
94° C	1 MIN
68° C	30 SEG
72° C	1 MIN
MANTENCIÓN	
4° C	

b. Prueba 2

En esta prueba, de acuerdo a los resultados obtenidos en la Prueba 1, la cantidad de dNTPs agregados al Mix de PCR fue de 0,6 μL por muestra, el protocolo se muestra en la Tabla 5:

Tabla 5: Protocolo de PCR nuclear modificado tras la prueba 1.

REACTIVOS	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION DE TRABAJO	CONCENTRACION EN MIX	MUESTRA
Buffer GoTaq (Promega)	5x	5x	1x	6 μL
MgCl ₂	25 mM			3.6 μL
dNTPs	100 mM	25 mM	0.25 mM	0.6 μL
Primer Cruzi 1 50 pmol/ μL	100 μM	10 μM	0.5 μM	1.5 μL
Primer Cruzi 2 50 pmol/ μL	100 μM	10 μM	0.5 μM	1.5 μL
Taq DNA Polymerase Platinum 5 U/ μL (Invitrogen)	5 U/ μL	5 U/ μL	0.6 U	0.12 μL
Bi distilled or MQ water				11.68 μL
Muestra		25 μL		5 μL
Volumen Final		30 μL		30 μL

c. Prueba 3

En esta prueba se repitió el proceso realizado en la prueba 2.

d. Prueba 4

En esta prueba agregamos 0,5 μL más de cada partidor nuclear (Tc1 y Tc2) en la preparación del Mix de PCR, el protocolo se muestra en la Tabla 6:

Tabla 6: Protocolo de PCR nuclear modificado tras Prueba 3.

REACTIVOS	CONCENTRACION INICIAL	CONCENTRACION DE TRABAJO	CONCENTRACION EN MIX	MUESTRA
Buffer GoTaq (Promega)	5x	5x	1x	6 µL
MgCl ₂	25 mM			3.6 µL
dNTPs	100 mM	25 mM	0.25 mM	0.6 µL
Primer Cruzi 1 50 pmol/µL	100 µM	10 µM	0.5 µM	2 µL
Primer Cruzi 2 50 pmol/µL	100 µM	10 µM	0.5 µM	2 µL
Taq DNA Polymerase Platinum 5 U/µL (Invitrogen)	5 U/µL	5 U/µL	0.6 U	0.12 µL
Bi distilled or MQ water				10.68 µL
Muestra		25 µL		5 µL
Volumen Final		30 µL		30 µL

viii. Confirmación de la condición de infectados en hijos de madres chagásicas

La condición de infectado chagásico en los hijos de madres chagásicas se determinó a partir de los siete meses de edad mediante las técnicas serológicas de ELISA e IFI IgG, según el protocolo descrito por Zulantay *et al.* (1998), con el fin de comprobar la especificidad de los partidores Tc1-Tc2 evaluados en este estudio.

a. Reacción de Inmunofluorescencia Indirecta

Esta reacción se realizó con el fin de determinar la existencia de anticuerpos dirigidos contra *T. cruzi*, utilizando como antígeno formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuén, 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 min a 4° C. Se agregó formalina para su muerte y fijación. Se realizaron 3 lavados con buffer PBS 7,2 (buffer fosfato salino). Se tomó una gota y se ve en el microscopio para determinar la densidad parasitaria. Se tomaron 25 uL de antígeno y se pusieron en cada pocillo (porta objeto con 8 pocillos) y luego se retiran 15 uL y se deja secar a T° ambiente, luego las placas son enfrentadas y guardadas en papel aluminio a -20° C, hasta su uso. Se realizaron las diluciones de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 de suero inactivado en 5 tubos de ensayo por paciente. Se cargó cada pocillo con 15 uL en orden de dilución. Se incubó a 37° C por 45 min. Luego se lavaron 2 veces con buffer PBS 10 min. por vez. Luego se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a TA. Una vez seca se cargaron con conjugado

fluorescente. Luego se incubaron a 37° C por 45 min y se lavaron de la misma forma mencionada. Una vez secas se agregaron 8 uL de solución de glicerina y se taparon con cubreobjetos, listas para su lectura. Se consideró como reacción positiva el título que sea 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 (BioMerieux, Ref. 75692) globulina de cabra anti IgG humana marcada con Isotiocianato de Fluoresceína.

b. Reacción de ELISA

Se utilizó el kit CHAGATEK ELISA. Este enzimoimmunoensayo en microtiras se basa en el método indirecto para la detección de anticuerpos anti- *T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano. Luego de la dilución apropiada de las muestras, éstas fueron incubadas en los pocillos de las microtiras de poliestireno, recubiertos con antígenos purificados de *T. cruzi*. Los anticuerpos anti- *T. cruzi* son específicamente capturados por los antígenos pegados en los pocillos, quedando unidos a la base sólida. Luego de un proceso de lavado, para la eliminación de las inmunoglobulinas no unidas, se incubó con anticuerpos monoclonales anti- IgG humana conjugada con peroxidasa. Este conjugado reacciona específicamente con los anticuerpos anti- *T. cruzi* inmunocapturados. El conjugado no unido fue eliminado por proceso de lavado y se reveló la presencia de peroxidasa mediante el agregado de una mezcla de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina (TMB). Esta incubación dio por resultado la aparición de un color azul, cuya intensidad depende de la concentración y de la afinidad de los anticuerpos anti- *T. cruzi* de la muestra. La reacción enzimática se detuvo mediante el agregado de ácido sulfúrico, lo que produjo un viraje del color azul al amarillo. El desarrollo de un color leve o nulo, indica la ausencia de niveles detectables de anti- *T. cruzi* en la muestra (Protocolo CHAGATEK ELISA, BIOMÉRIEUX). Se utilizó como antígeno formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahúen. Se utilizaron 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). Parte de este análisis fue efectuado en el Laboratorio de Parasitología ISP.

ix. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v.17.0. En la descripción se utilizó la tabla de frecuencia y de asociación. En el análisis de los resultados se utilizó la Prueba Mc Nemar, considerando significativo un p-value < 0,05.

VII. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en la estandarización y en la aplicación de los protocolos de PCR kinetoplastídico y nuclear, sobre las muestras control y las muestras de los sujetos de investigación. También se presentan los resultados de los exámenes serológicos realizados en el seguimiento de los RN.

i. Resultados estandarización de PCRn

a. Prueba 1



Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en las Tablas 3 y 4.

Tras la electroforesis, no se observó ninguna banda en el gel, como tampoco banda en el carril de controles (positivo y negativo). El resultado hizo suponer que el problema sería la cantidad en que fueron agregados los reactivos y no la calidad de las muestras, por lo que se determinó repetir el procedimiento, utilizando las mismas muestras, pero esta vez agregando el doble de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), es decir se aumentó en 0,3 μ L la cantidad de dicho reactivo en la preparación del Mix de PCR, esto en caso de que la falta de desoxinucleótidos fuera la causa del resultado obtenido. Además se determinó agregar una muestra positiva más.

b. Prueba 2

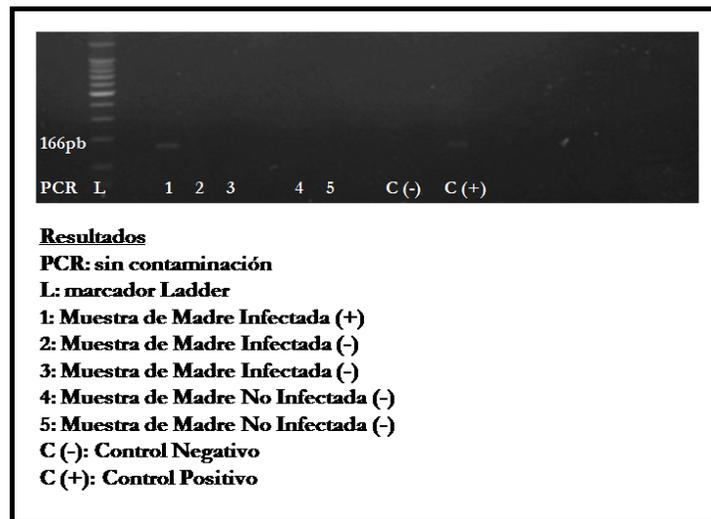


Figura 2: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en las Tablas 4 y 5.

En los resultados se obtuvo positividad en la primera de las tres muestras positivas (carril 1) y negatividad en las dos muestras negativas. El control del Mix (PCR) y los controles negativo (C (-)) y positivo (C (+)), no presentaron contaminación y el control positivo tuvo una muy leve intensidad. Determinamos en esta instancia, por tanto, repetir el mismo procedimiento aplicado en la prueba 2, en la prueba 3.

c. Prueba 3

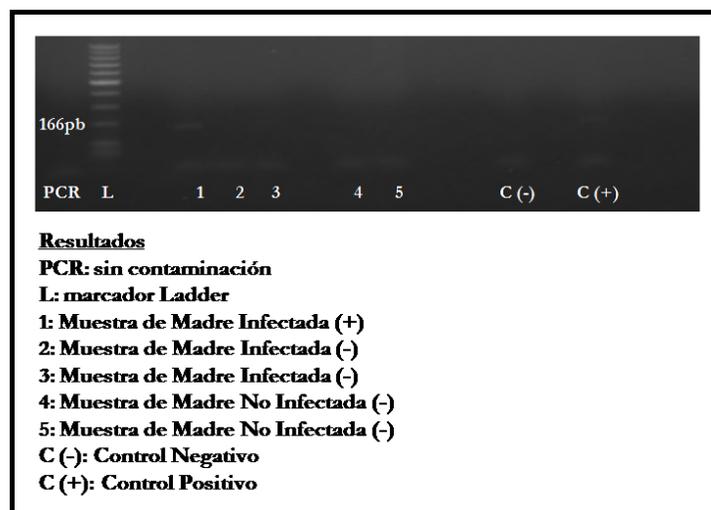


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en las Tablas 4 y 5.

Tras obtener los mismos resultados en las Pruebas 2 y 3, determinamos aumentar la cantidad de los partidores Tc1 y Tc2 en 0.5 µl, quedando en el total de 2 µl cada uno. Esto con el objetivo de obtener positividad en las muestras de madres infectadas con *T. cruzi*.

d. Prueba 4

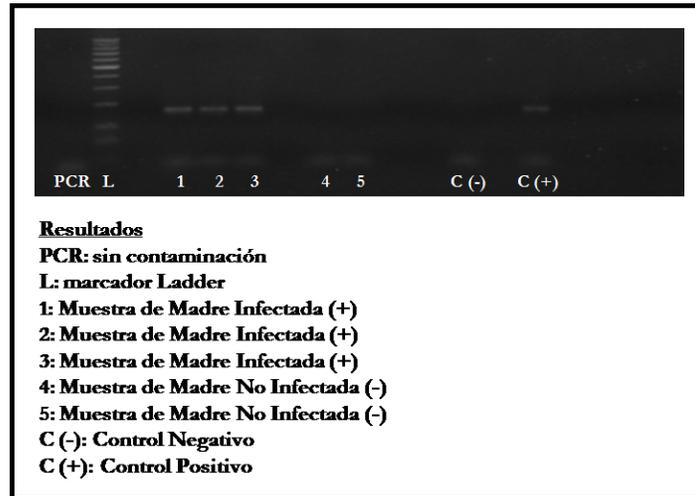


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa al 2% de Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en las tablas 4 y 6.

En esta prueba obtuvimos positividad en las 3 muestras de madres infectadas y negatividad en las dos muestras de madres no infectadas. El control mix (PCR) y los controles negativo (C (-)) y positivo (C (+)) no presentaron contaminación.

Una vez obtenidos los resultados esperados, aplicamos este protocolo en los PCR nucleares que se llevaron a cabo en este estudio.

ii. Resultados de electroforesis de muestras control negativo (Grupo V)

En la Figura 5, se observan los resultados obtenidos tras la reacción de PCR con partidores kinetoplásticos (121-122), sobre muestras de binomios Madre-RN no infectados con *T. cruzi*. Todas las muestras resultaron negativas.

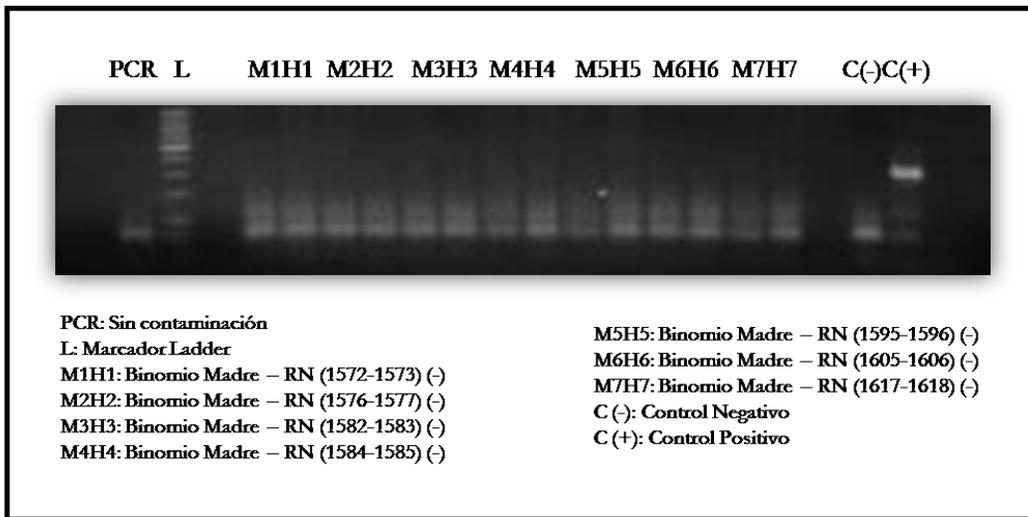


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en material y métodos para PCRk.

En la Figura 6, se observan los resultados obtenidos tras la reacción de PCR con partidores nucleares (Tc1-Tc2), sobre muestras de binomios Madre-RN no infectados con *T. cruzi*. Todas las muestras resultaron negativas.

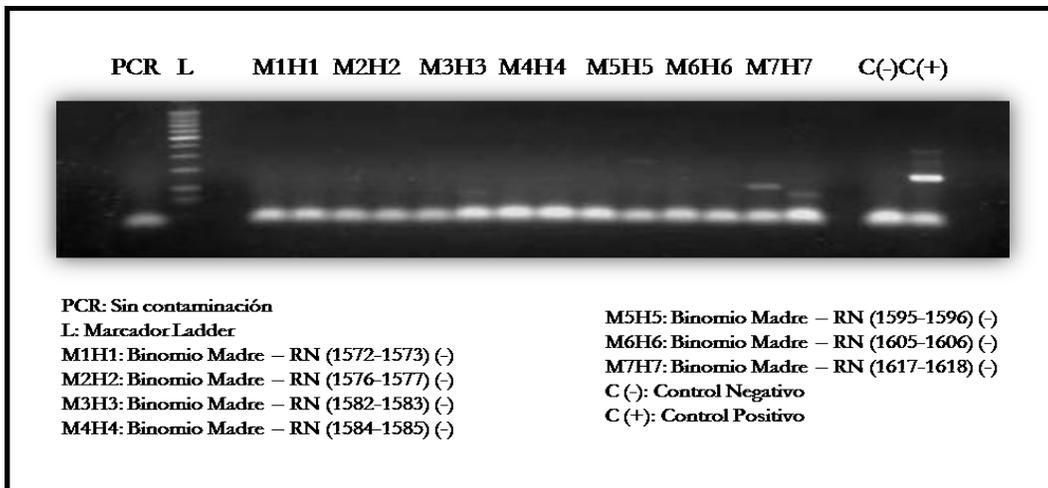


Figura 6: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en la estandarización de PCRn de material y métodos.

iii. Aplicación de partidores 121-122 en la reacción de PCRk en muestras de madres y sus RN.

a. Resultados PCRk Madres Chagásicas Grupo I

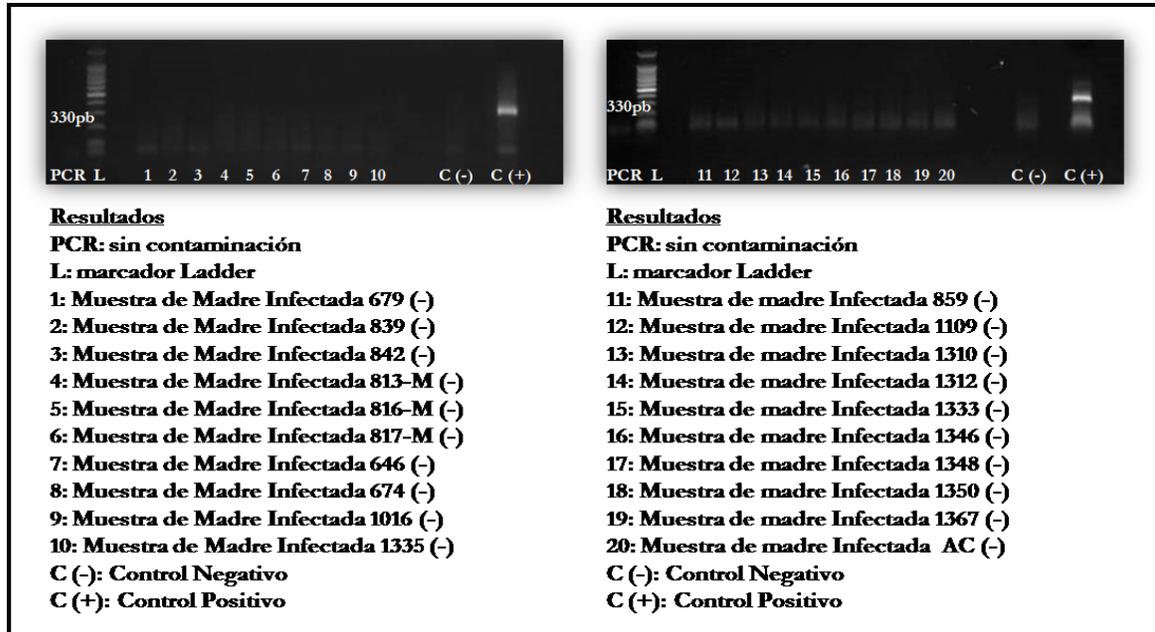


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en material y métodos para PCRk. Se observó que todas las muestras resultaron negativas.

b. Resultados PCRk RN Grupo II

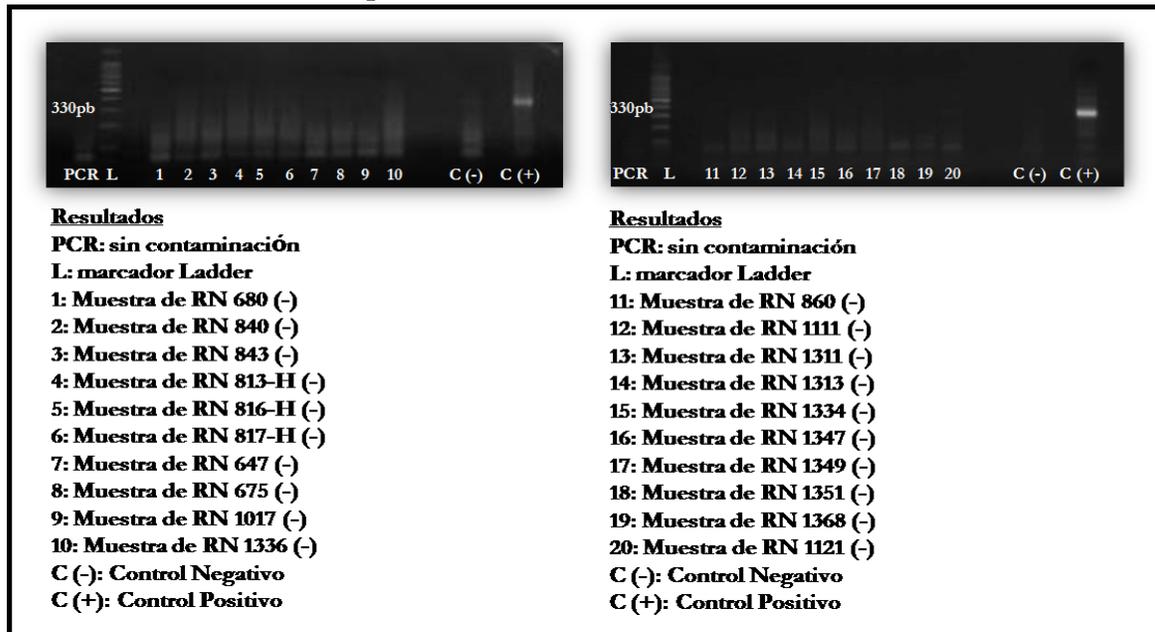


Figura 8: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en material y métodos para PCRk. Todas las muestras resultaron negativas.

c. Resultados PCRk Madres Chagásicas Grupo III

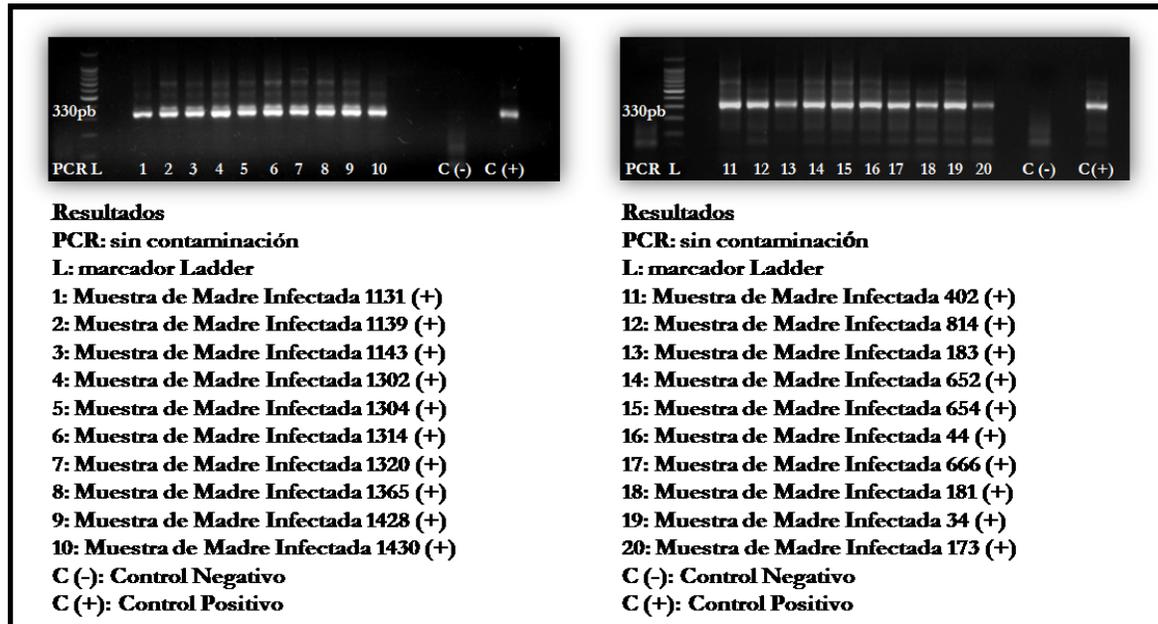


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en material y métodos para PCRk. Todas las muestras resultaron positivas.

d. Resultados PCRk RN Grupo IV

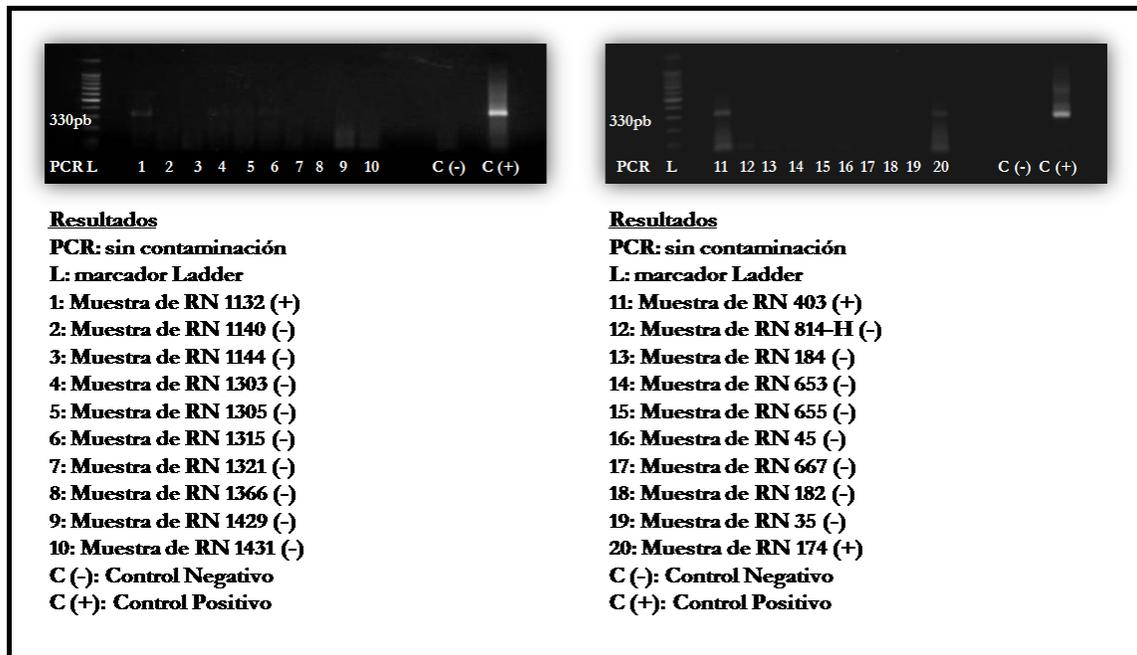


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores 121-122. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en material y métodos para PCRk. Se Observó positividad en las muestras de los carriles 1, 11 y 20.

iv. Aplicación de partidores nucleares Tc1-Tc2 en el protocolo estandarizado de PCRn en muestras de madres y sus RN.

a. Resultados PCRn Madres Chagásicas Grupo I

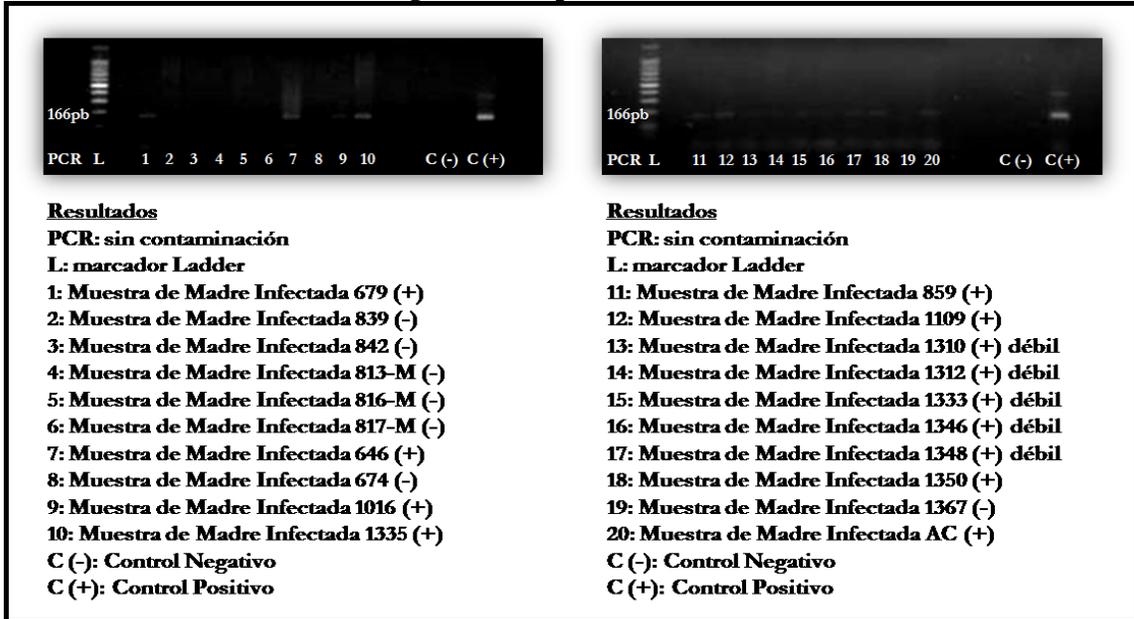


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en la estandarización de PCRn de material y métodos. Se observó positividad en las muestras de los carriles 1, 7, 9-18 y 20.

b. Resultados PCRn RN Grupo II

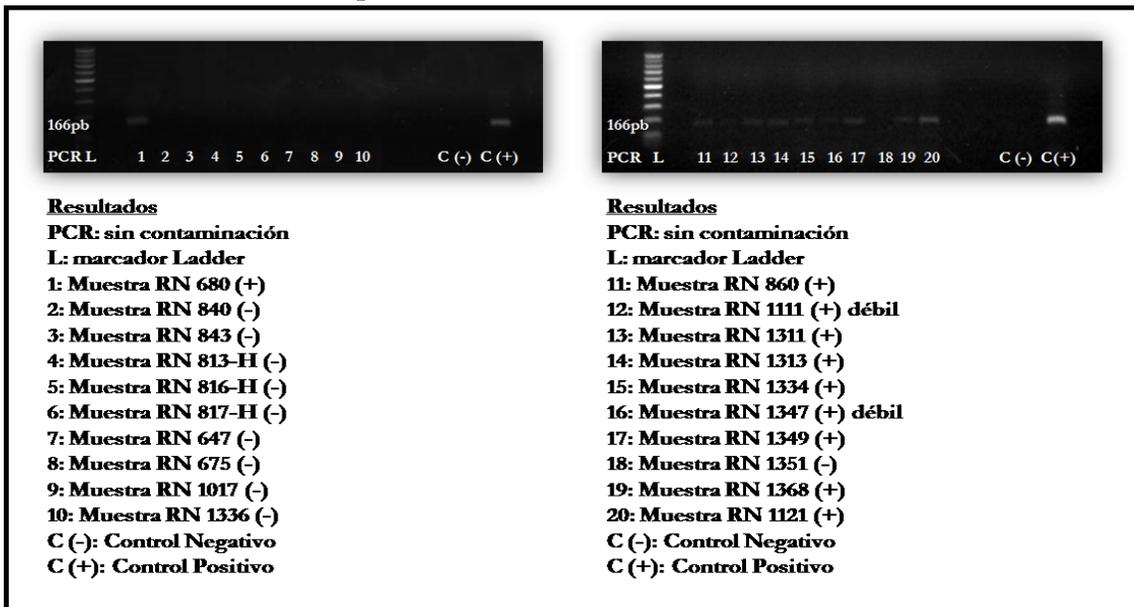


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en la estandarización de PCRn de material y métodos. Se observó positividad en las muestras de los carriles 1, 11-17, 19 y 20.

c. Resultados PCRn Madres Chagásicas Grupo III

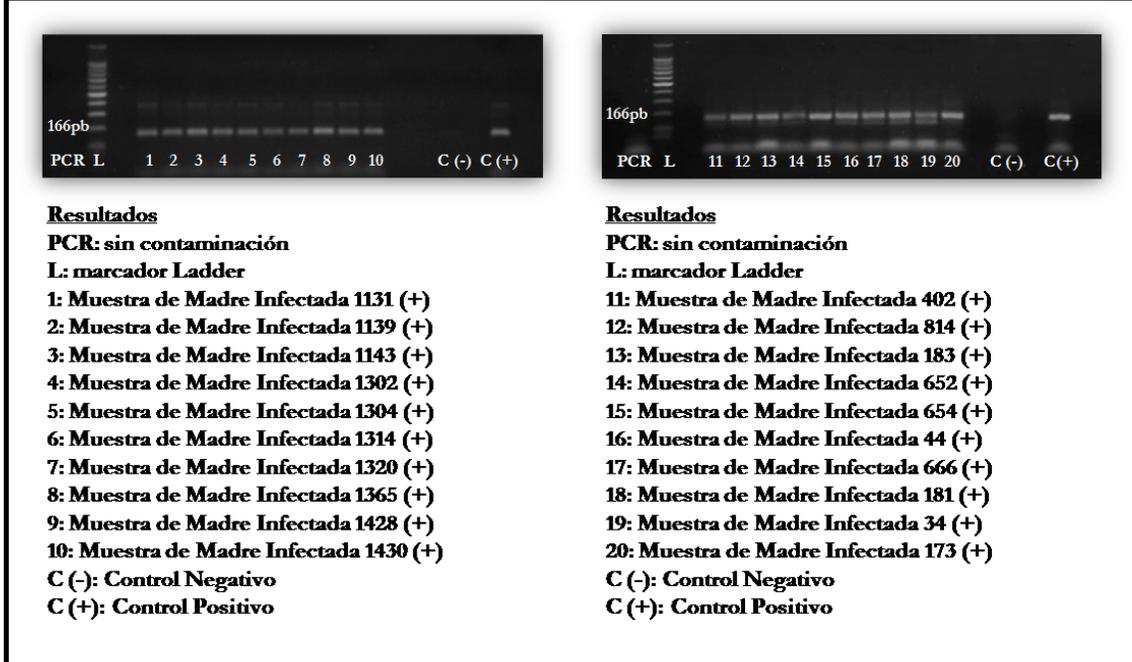


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en la estandarización de PCRn de material y métodos. Se observó positividad en todas las muestras.

d. Resultados PCRn RN Grupo IV



Figura 14: Electroforesis en gel de agarosa al 2% con los partidores Tc1-Tc2. Reacción de PCR realizada bajo las condiciones descritas en la estandarización de PCRn de material y métodos. Se observó positividad en las muestras de los carriles 1, 2, 7, 9, 10, 11, 13, 16, 19 y 20.

v. Resumen de resultados de los binomios Madre-RN, pertenecientes al grupo en estudio, sometidos a PCRk y PCRn.

Tabla 7: Resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los grupos, al aplicar las técnicas de PCRk y PCRn evaluadas en este estudio.

Binomio Madre/RN Grupo I/Grupo II	Resultados PCRk Madre/RN Grupo I/Grupo II		Resultados PCRn Madre/RN Grupo I/Grupo II		Binomio Madre/RN Grupo III/Grupo IV	Resultados PCRk Madre/RN Grupo III/Grupo IV		Resultados PCRn Madre/RN Grupo III/Grupo IV	
679/680	(-)	(-)	(+)	(-)	1131/1132	(+)	(+)	(+)	(+)
839/840	(-)	(-)	(-)	(-)	1139/1140	(+)	(-)	(+)	(+)
842/843	(-)	(-)	(-)	(-)	1143/1144	(+)	(-)	(+)	(-)
813-M/813-H	(-)	(-)	(-)	(-)	1302/1303	(+)	(-)	(+)	(-)
816-M/816-H	(-)	(-)	(-)	(-)	1304/1305	(+)	(-)	(+)	(-)
817-M/817-H	(-)	(-)	(-)	(-)	1314/1315	(+)	(-)	(+)	(-)
646/647	(-)	(-)	(+)	(-)	1320/1321	(+)	(-)	(+)	(+)
674/675	(-)	(-)	(-)	(-)	1365/1366	(+)	(-)	(+)	(-)
1016/1017	(-)	(-)	(+)	(-)	1428/1429	(+)	(-)	(+)	(+)
1335/1336	(-)	(-)	(+)	(-)	1430/1431	(+)	(-)	(+)	(+)
859/860	(-)	(-)	(+)	(+)	402/403	(+)	(+)	(+)	(+)
1109/1111	(-)	(-)	(+)	(+)	814/814-H	(+)	(-)	(+)	(-)
1310/1311	(-)	(-)	(+)	(+)	183/184	(+)	(-)	(+)	(+)
1312/1313	(-)	(-)	(+)	(+)	652/653	(+)	(-)	(+)	(-)
1333/1334	(-)	(-)	(+)	(+)	654/655	(+)	(-)	(+)	(-)
11346/1347	(-)	(-)	(+)	(+)	44/45	(+)	(-)	(+)	(+)
1348/1349	(-)	(-)	(+)	(+)	666/667	(+)	(-)	(+)	(-)
1350/1351	(-)	(-)	(+)	(-)	181/182	(+)	(-)	(+)	(-)
1367/1368	(-)	(-)	(-)	(+)	34/35	(+)	(-)	(+)	(+)
AC/1121	(-)	(-)	(+)	(+)	173/174	(+)	(+)	(+)	(+)

Tabla 8: Porcentaje de positividad con partidores kinetoplásticos (121-122) y nucleares (Tc1-Tc2) en los grupos de estudio.

	MADRES			RN		
	GRUPO I (20)	GRUPO III (20)	TOTAL MADRES (40)	GRUPO II (20)	GRUPO IV (20)	TOTAL RN (40)
PCRk (+)	0 (0%)	20 (100%)	20 (50%)	0 (0%)	3 (15%)	3 (7,5%)
PCRn (+)	13 (65%)	20 (100%)	33 (82,5%)	10 (50%)	10 (50%)	20 (50%)

El grupo I estuvo constituido por madres negativas a PCRk y el grupo III por madres positivas a PCRk. El 82,5% del total de las madres (40) presentó PCRn positivo. El 7,5% del total de RN (40) presentó PCRk positivo, y el 50% de los RN presentó PCRn positivo.

vi. Estudios Serológicos de Seguimiento al año de edad de RN

Con el fin de determinar la condición definitiva de los RN, se realizaron estudios serológicos, que incluyeron Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA, en muestras de RN que participaron de este estudio, tomadas al año de edad. Al seguimiento no se detectó Inmunoglobulina G en las muestras de los RN del Grupo II (Tabla 9). En el seguimiento del Grupo IV se detectó IgG en muestras de casos diagnosticados congénitos con la técnica PCRk, casos 403 y 174. No se pudo determinar la condición del RN 1132 por abandono del estudio (Tabla 10).

Tabla 9: Resultados de exámenes serológicos, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA, en muestras de sangre de RN (Grupo II), tomadas al año de edad.

GRUPO II					
	IFI	ELISA		IFI	ELISA
680	(-)	(-)	860	(-)	(-)
840	(-)	(-)	1111	(-)	(-)
843	(-)	(-)	1311	(-)	(-)
813-H	(-)	(-)	1313	(-)	(-)
816-H	(-)	(-)	1334	(-)	(-)
817-H	(-)	(-)	1347	(-)	(-)
647	(-)	(-)	1349	(-)	(-)
675	(-)	(-)	1351	(-)	(-)
1017	(-)	(-)	1368	(-)	(-)
1336	(-)	(-)	1121	(-)	(-)

Para IFI se utilizó Fluoline G, globulina anti-IgG humana. Para ELISA se utilizó anticuerpos monoclonales anti-IgG humana.

Tabla 10: Resultados de exámenes serológicos, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA, en muestras de sangre de RN (Grupo IV), tomadas al año de edad.

GRUPO IV					
	IFI	ELISA		IFI	ELISA
1132	ND	ND	403	(+)	(+)
1140	(-)	(-)	814-H	(-)	(-)
1144	(-)	(-)	184	(-)	(-)
1303	(-)	(-)	653	(-)	(-)
1305	(-)	(-)	655	(-)	(-)
1315	(-)	(-)	45	(-)	(-)
1321	(-)	(-)	667	(-)	(-)
1366	(-)	(-)	182	(-)	(-)
1429	(-)	(-)	35	(-)	(-)
1431	(-)	(-)	174	(+)	(+)

ND: No Determinado.

Para IFI se utilizó Fluoline G, globulina anti-IgG humana. Para ELISA se utilizó anticuerpos monoclonales anti-IgG humana.

vi. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS v.17.0. En la descripción se utilizó la tabla de frecuencia y de asociación. En el análisis de los resultados se utilizó la Prueba de Mc Nemar, considerando significativo un p-value < 0,05.

a. Análisis Grupo I

Tabla 11: Análisis estadístico de madres PCRk negativo (Grupo I), con PCRn positivo.

	Frecuencia	Porcentaje válido
(-)	7	35.0
(+)	13	65.0
Total	20	100.0

Se observa que el 65% de las madres con PCRk negativo presentaron PCRn positivo.

Tabla 12: Análisis estadístico de madres PCRk negativo (Grupo I), RN PCRk.

	Frecuencia	Porcentaje Válido
(-)	20	100.0
(+)	0	0.0

Se observa que el 0% de los RN hijos de madres con PCRk negativo, presentaron PCRk positivo.

Tabla 13: Análisis estadístico de madres PCRk negativo (Grupo I), y RN PCRn positivo.

	Frecuencia	Porcentaje válido
(-)	10	50.0
(+)	10	50.0
Total	20	100.0

Se observa que el 50% de los RN hijos de madres con PCRk negativo, presentaron PCRn positivo.

b. Análisis Grupo III.

Tabla 14: Análisis estadístico de madres PCRk positivo (Grupo III), con PCRn positivo.

	Frecuencia	Porcentaje Válido
(-)	0	0.0
(+)	20	100.0

Se observa que el 100% de las madres tienen PCR nuclear positivo.

Tabla 15: Análisis estadístico de madres PCRk positivo (Grupo III), y RN PCRk positivo.

	Frecuencia	Porcentaje válido
(-)	17	85.0
(+)	3	15.0
Total	20	100.0

Se observa que el 15% de los recién nacidos tienen PCR kinetoplastídico positivo.

c. Análisis Grupo IV, comparación PCRk y PCRn en RN. Prueba de McNemar

Tabla 16: Análisis estadístico PCRk/PCRn de RN hijos de madres PCRk positivo (Grupo IV). Prueba McNemar, P-value=0,016.

			Nuclear		Total
			(-)	(+)	
Kinetoplastídico	(-)	Recuento	10	7	17
		% within kinetoplastídico	58.8	41.2	100.0
		% within nuclear	100.0	70.0	85.0
		Total	50.0	35.0	85.0
	(+))	Recuento	0	3	3
		% within kinetoplastídico	.0	100.0	100.0
		% within nuclear	.0	30.0	15.0
		Total	.0	15.0	15.0
Total	Recuento	10	10	20	
	%within kinetoplastídico	50.0	50.0	100.0	
	% within nuclear	100.0	100.0	100.0	
	Total (%)	50.0	50.0	100.0	

Se observa que el 41,2% de los recién nacidos con PCRk negativo presentaron PCRn positivo, y que el 100% con PCRk positivo tienen PCRn positivo, lo que significa que hay diferencias significativas entre ambos exámenes, PCRk vs PCRn. (Mc NEMAR, P-value=0.016).

También se observó que el 30% de los recién nacidos con PCRn positivo se detectan mediante PCRk.

d. Análisis de sensibilidad y especificidad

Para este análisis se utilizó como gold estándar la prueba de IFI. La prueba gold estándar para los RN es el parasitológico directo. Este examen debe ser realizado por el hospital al nacimiento del RN, hijo de madre chagásica confirmada, sin embargo no siempre se realiza. Gracias al seguimiento serológico de los RN se pudo determinar la sensibilidad y especificidad de PCRn en los RN.

Se observó una sensibilidad y especificidad del 100% de PCRk, en el total de RN al compararlo con la prueba gold estándar IFI (Tabla 17). Se observó una sensibilidad del 100% y especificidad del 54,1% de PCRn, al compararlo con la prueba gold estándar IFI (Tabla 18). F(+) = 45,9%.

Tabla 17: IFI versus PCRk en RN de los grupos II y IV.

Crosstab					
			RNk		Total
			(-)	(+)	
IFI	(-)	Recuento	37	0	37
		% within IFI	100,0%	,0%	100,0%
	(+))	Recuento	0	2	2
		% within IFI	,0%	100,0%	100,0%
	ND	Recuento	0	1	1
		% within IFI	,0%	100,0%	100,0%
Total		Recuento	37	3	40
		% within IFI	92,5%	7,5%	100,0%

Tabla 18: IFI versus PCRn en RN de los grupos II y IV.

Crosstab					
			RNn		Total
			(-)	(+)	
IFI	(-)	Recuento	20	17	37
		% within IFI	54,1%	45,9%	100,0%
	(+))	Recuento	0	2	2
		% within IFI	,0%	100,0%	100,0%
	ND	Recuento	0	1	1
		% within IFI	,0%	100,0%	100,0%
Total		Recuento	20	20	40
		% within IFI	50,0%	50,0%	100,0%

IX. DISCUSIÓN

La infección chagásica en América afecta a 17 países, con aproximadamente 10 millones de personas infectadas, procedentes de áreas urbanas y peri-urbanas (Apt *et al.*, 2008). Gracias a la “Iniciativa del Cono Sur para la eliminación del vector biológico”, este se logró controlar en forma importante reduciendo la transmisión vía vector en un 50% (Guhl, 2007). Este avance permitió que la comunidad científica se enfocara en la investigación de otros medios de transmisión, como son la transmisión congénita y por transfusión sanguínea. Hoy en día, la transmisión congénita se ha transformado en un problema de salud pública que afecta a todos los países, incluyendo USA y Europa, debido a la inmigración de personas infectadas con *T. cruzi* (Stramer *et al.*, 2007). Las migraciones de personas infectadas también pueden ocurrir entre regiones de países endémicos (Brutus *et al.*, 2008). En Chile, durante el año 1992, un 5,8% del total de mujeres del país, cambiaron de región de residencia habitual. Durante el 2002 este valor fue de 5,4% (INE, 2007), lo que significa que el fenómeno de migración es relevante, sin embargo, se desconoce hasta ahora la importancia epidemiológica de los fenómenos migratorios campo-ciudad para la enfermedad de Chagas en nuestro país (Apt *et al.*, 2010).

La prevalencia de infecciones crónicas por *T. cruzi* en mujeres, la tasa de transmisión y la morbilidad y mortalidad de la infección congénita varían ampliamente según las áreas bajo estudio. Información de los efectos de tales infecciones crónicas en la preñez, crecimiento fetal y salud de RN no infectados o madres infectadas sigue siendo contradictoria. De hecho en algunos estudios, se menciona que las infecciones maternas inducen un incremento del riesgo de pérdida de la preñez o prematuridad (de Castilho y Da Silva, 1976; Schenone *et al.*, 1985) mientras que en otros no muestran ningún efecto (Blanco *et al.*, 2000). Con respecto a la transmisión congénita, diversos autores han señalado porcentajes de transmisión materno-fetal que difieren ampliamente. Muñoz *et al.* (1992), estimaron que la transmisión congénita era de 2,1 a 10%, García *et al.* (2001) por su parte, la estimaron de 13,7 a 28,2%. Y así, aún no se tienen datos reales de la importancia de este problema de salud pública. Incluso en Bolivia, que es uno de los países con más alta endemia, existe muy poca información disponible sobre las consecuencias de la transmisión congénita (Torrice *et al.*, 2004). Además, se debe considerar la sub-notificación, lo que aumentaría las cifras entre 6 a 10 veces el valor estimado (Gürtler *et al.*, 2003).

A pesar de que el porcentaje de transmisión vía congénita, que depende, entre otros factores, del nivel de parasitemia y de la inmunidad materna, no superaría el 10%, la importancia

de su estudio radica en que el tratamiento del RN infectado es fundamental para asegurar un 100% de eficacia quimioterapéutica de la infección chagásica.

Muñoz *et al.* (1992), ya señalaban en su estudio de casos congénitos sintomáticos, que el diagnóstico precoz es de esencial importancia en relación al efecto del tratamiento específico. Al respecto señala que las drogas actualmente en uso, nifurtimox y benznidazol son eficaces cuando se les aplica oportunamente, obteniendo mejoría clínica e incluso cura sin secuelas con erradicación de la infección. También señala que los casos tardíos generalmente se deben a infecciones congénitas asintomáticas, las que deben pesquisarse con el estudio sistemático del binomio madre-hijo. Lo anterior es válido, ya que en el presente estudio los sujetos de investigación correspondían a casos asintomáticos, entre los cuales encontramos dos casos congénitos, los cuales sin el estudio no se habrían pesquisado, y que podrían avanzar a un estado agudo con parasitemia, luego a fase indeterminada asintomática y finalmente a fase crónica con sintomatología y deterioro orgánico con compromiso cardíaco (miocardiomiopatía) y gastrointestinal (megaesófago y megacolon) principalmente.

En Chile, el diagnóstico serológico de *T. cruzi* se realiza rutinariamente mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA IgG (Zulantay *et al.*, 1998). La sensibilidad de estas técnicas depende de la fase de la enfermedad y del tipo de inmunoglobulina estudiada. La OMS recomienda efectuar al menos dos técnicas serológicas convencionales para confirmar la infección (Noireau, 1999; Brener *et al.*, 2000). El diagnóstico parasitológico en cambio, se basa en la demostración de la presencia de *T. cruzi* mediante pruebas directas, aplicadas fundamentalmente en la fase aguda de la infección adquirida. Las más utilizadas son: examen microscópico de sangre al fresco, microstrout, gota gruesa, xenodiagnóstico (XD) y últimamente PCR.

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 de la infección (Junqueira *et al.*, 1996). La amplificación de secuencias de ADN a través del método de PCR es una técnica altamente sensible, y es particularmente útil en la detección de agentes que están presentes en bajos títulos en muestras clínicas. En el caso de la enfermedad de Chagas, la detección directa de *T. cruzi* en sangre periférica es extremadamente difícil y métodos directos de hibridación de ADN han sido probados sin éxito (Avila *et al.*, 1993). Sin embargo, diversos estudios en el binomio madre-recién nacido han demostrado la utilidad de la técnica de PCR, tanto con partidores kinetoplastídicos como con partidores nucleares de *T. cruzi*. Kirchhoff *et al.* (1996), compararon la PCR con métodos microscópicos en infecciones agudas y crónicas. En ambos casos, el método

de PCR presentó mayor sensibilidad que la microscopía. También Virreira *et al.*, el año 2003, en un estudio comparativo de técnicas de PCR en casos congénitos, señalaron que al usar los partidores nucleares Tcz1-Tcz2 el límite de detección de ADN fue el equivalente al menos, a 0,002 parásitos por prueba, una sensibilidad 10 veces mayor que al usar partidores kinetoplastídicos.

En este trabajo hemos comparado el rendimiento de los partidores kinetoplastídicos 121-122 y nucleares Tc1-Tc2, mediante PCR, en la detección de *T. cruzi* en madres chagásicas crónicas y sus recién nacidos.

Nuestros resultados demuestran el buen rendimiento de los partidores kinetoplastídicos en la detección de *T. cruzi*. Previo a la utilización de los partidores nucleares Tc1-Tc2 sobre las muestras en estudio, la técnica de PCRk detectó *T. cruzi* en el 7.5% de los RN (tres muestras), considerando RN hijos de madres negativas y positivas a PCRk. Este porcentaje es alto si consideramos datos que señalan que la transmisión congénita se produce en el 0.7 a 10% de los casos (Cusnaider *et al.*, 2004). Sin embargo, al aplicar los partidores nucleares descubrimos mayor positividad en muestras negativas a PCRk.

En todas las muestras de madres con resultados positivos a PCRk (Grupo III), obtuvimos resultados positivos al aplicar PCRn, con una concordancia del 100%. En relación a las muestras de madres negativas a PCRk (Grupo I), se observó un 65% de positividad al aplicar los partidores Tc1-Tc2 con la técnica PCRn. Al considerar los resultados de ambos grupos (I y III), se obtiene una positividad del 82,5%, lo que evidencia la alta sensibilidad de los partidores nucleares, concordando con resultados o antecedentes descritos en literatura.

Al analizar los resultados de los RN del Grupo IV, encontramos, como primera observación, que todos los RN de este grupo que presentaron PCRk positivo, presentaron PCRn positivo, es decir, PCRn detectó *T. cruzi* en el 100% de las muestras de RN positivas a PCRk. Sin embargo, entre las muestras de RN negativas con PCRk, existieron diferencias significativas entre los PCRk y PCRn, ya que se observó que el 41,2% de aquellas que presentaron PCRk negativo presentaron PCRn positivo, es decir, al usar partidores nucleares se detectó *T. cruzi* en un 30% más de muestras que al usar partidores kinetoplastídicos. Si consideramos el total de RN, observamos que PCRk detectó *T. cruzi* en 3 muestras (7,5%), mientras que PCRn detectó *T. cruzi* en 20 muestras (50%). Estos resultados se correlacionan con aquellos de Virreira *et al.*, señalados anteriormente, que señalan mayor sensibilidad de los partidores nucleares con respecto a los kinetoplastídicos.

Moser *et al.*, el año 1989, en su estudio sobre la detección de *T. cruzi* mediante PCR, indicaron que su elección por el uso de un partidor nuclear se debía principalmente a que habría aproximadamente 1.8 veces más copias del elemento de 195-pb por organismo como hay de regiones de minicírculos constantes amplificables en el kinetoplasto. Esta estimación estuvo basada en el hecho de que el minicírculo constituye aproximadamente la misma fracción del DNA total del microorganismo, al igual que el elemento de 195-bp, pero la secuencia del minicírculo de 1450-pb de *T. cruzi* tiene solo 4 copias de la región altamente conservada de 120-bp, es decir, existe 1.8 veces más ADN amplificable en el núcleo que en el kinetoplasto por lo que sería más probable su amplificación.

Los investigadores concuerdan en que la detección de ADN constituye una prueba real de la existencia de parásitos. El ADN detectado en sangre es originado de parásitos extracelulares que fueron liberados o destruidos recientemente. Después de inyectar ADN kinetoplastídico (ADNk) de *T. cruzi* en altas dosis en músculo, el ADNk se detecta en sangre dos días después. Sin embargo, debido a que el parásito es infectante en la forma tripomastigote y no como una porción de ADN, no se puede asegurar que el ADN detectado por PCR en sangre es una prueba confiable de formas viables de *T. cruzi*. Una alternativa, es la posibilidad de que fragmentos de amastigotes (formas infectantes en tejidos) alcancen el torrente sanguíneo después de interactuar con el sistema inmune (Tarleton y Zhang, 1999).

Al igual que Tarleton y Zhang, en nuestro estudio tampoco podemos asegurar que la detección de parasitemia al aplicar PCRn en los RN corresponde a casos de transmisión de formas infectantes de *T. cruzi* desde la madre al RN. Sin embargo, pudimos comprobar, gracias a los exámenes serológicos de seguimiento al año de edad en los RN, que este ADN amplificado y detectado mediante la técnica de PCRn no correspondía a parásitos viables, ya que, con excepción de dos casos congénitos confirmados y uno no determinado, todas las muestras de los RN al año de edad presentaron exámenes serológicos negativo (IFI y ELISA). Esto evidencia la alta sensibilidad de la técnica de PCRn, ya que se demuestra con estos resultados, que los partidores nucleares (Tc1-Tc2) fueron capaces de amplificar trazas de ADN no viable en el 42.5% de las muestras de RN, algo no logrado con los partidores kinetoplastídicos (121-122), los cuales sólo amplificaron ADN viable de los casos congénitos diagnosticados. Este descubrimiento reafirma el hecho de que la técnica de PCR por sí sola no determina la condición parasitológica de un individuo.

Con el fin de determinar si los casos positivos a PCRn corresponden realmente a trazas o parásitos no viables de *T. cruzi*, proponemos la secuenciación de las bandas pesquisadas con los

partidores nucleares, con el fin de analizar la homología con secuencias específicas de *T. cruzi* (Silva *et al.*, 2008). Otra herramienta que nos sería de utilidad para definir si estamos ante la presencia de *T. cruzi*, es PCR Tiempo Real, técnica que además de cuantificar la carga parasitaria (Duffy *et al.*, 2009), nos permitiría evidenciar temperaturas de hibridación esperadas para *T. cruzi*, entre 82-84°C (Schijman, 2008). En caso que se confirme la presencia de *T. cruzi* en la sangre de cordón del RN no congénito, se demostraría que trazas de ADN o parásitos no viables, son capaces de atravesar la placenta y dar cuenta de un resultado de PCRn positivo en el RN hijo de madre chagásica.

En base a los resultados de los exámenes serológicos convencionales utilizados como gold estándar y aplicados a los RN evaluados en este estudio, se pudo determinar la sensibilidad y especificidad de las técnicas de PCRk y PCRn. De esta manera, se determinó que PCRk presentó una sensibilidad y especificidad del 100%, ya que fue capaz de detectar los casos verdaderos positivos, sin detectar falsos positivos ni falsos negativos, lo que demuestra que es una prueba confiable en el diagnóstico temprano de la infección chagásica en RN hijos de madres chagásicas.

A pesar de que PCRn detectó mayor cantidad de casos positivos en los RN, estos correspondieron en su mayoría a falsos positivos, por lo que esta técnica obtuvo una sensibilidad del 100% pero una especificidad de sólo un 54,1% en los RN, por lo que no sería recomendable aplicar esta prueba en RN si lo que se quiere es diagnosticar la infección en una fase temprana para la aplicación de tratamiento, esto debido a que los medicamentos a disposición, nifurtimox y benznidazol, presentarían efectos secundarios a su aplicación, y por tanto, se pondría en riesgo la salud de RN diagnosticados erróneamente como positivos.

La baja especificidad obtenida se ha atribuido, como ya se mencionó anteriormente, a la detección de trazas de ADN de *T. cruzi*, los cuales, posiblemente, eran restos de parásitos que interactuaron con los anticuerpos maternos, o que simplemente traspasaron la placenta. Esta teoría, sin embargo, será confirmada mediante la cuantificación y secuenciación del ADN de dichas muestras.

Los exámenes serológicos en recién nacidos provenientes de madres infectadas deben realizarse posterior a los 8 meses de edad ya que antes de este período pueden arrojar falsos positivos debido a la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* que pueden ser producto de la transferencia pasiva de anticuerpos maternos, los cuales desaparecen generalmente a los seis meses de edad (Schijman *et al.*, 2003), es por esta razón que solo después de este periodo los anticuerpos de este isotipo pueden ser utilizados para la confirmación de la infección con *T. cruzi*. Este hecho es de gran importancia desde el punto de vista del diagnóstico, ya que aunque los

métodos parasitológicos convencionales (examen de sangre en fresco, gota gruesa, hemocultivo y xenodiagnóstico) son ampliamente empleados para determinar la infección neonatal, el número de parásitos en sangre generalmente es bajo como para ser detectado (Russomando *et al.*, 1998).

Si observamos los resultados de los RN de los grupos II y IV, hijos de madres negativas y positivas a PCRk al momento del parto, respectivamente, al someterlos a análisis estadístico mediante la prueba exacta de Fisher, no hubo diferencias significativas entre ambos grupos ($p\text{-value}=0,231$), lo que nos permite inferir que la parasitemia materna no es un factor preponderante en la transmisión placentaria de *T. cruzi* al recién nacido, contrario a lo sugerido por diversos investigadores (Carlier y Torrico, 2003; Hermann *et al.*, 2004), los que señalan que al existir parasitemia positiva al parto en la madre, existiría mayor posibilidad de transmisión congénita. En el estudio de Moretti *et al.* (2005), sobre transmisión congénita en tres madres chagásicas agudas, se señala que a pesar de existir alta parasitemia al parto, la carencia de transmisión en dos de los casos estudiados, sugiere que la carga parasitaria no parece ser un factor relevante en la transmisión materno-fetal de *T. cruzi*.

Es importante destacar que si bien en la literatura general y especializada de la disciplina, se esperan importantes niveles de parasitemia en los recién nacidos congénitos, en este estudio con reacciones de PCR comparables a la madre con parasitemia demostrada, en los dos casos congénitos, las bandas específicas de 330 pb observadas no son de una intensidad marcada, lo que nos lleva a preguntarnos, si existiría alguna relación entre los niveles de parasitemia en RN sintomáticos y asintomáticos. Los dos casos congénitos fueron aparentemente sanos al nacer, con peso y talla normal y sus madres inmunocompetentes. Esto considerando que en el presente estudio, no se realizaron ensayos de nested-PCR, sino que en todos los ensayos, se utilizó la muestra original del RN obtenida en el momento del parto.

En Chile, no existe un Programa de Control para la enfermedad de Chagas, no obstante la publicación de recomendaciones a través de las Guías Clínicas (Apt *et al.*, 2006; 2010). La presente investigación, llevada a cabo en el marco de un proyecto piloto en la Provincia de Choapa, IV Región de Chile, contribuye al conocimiento actual de la transmisión congénita de *T. cruzi* en sus aspectos diagnósticos y plantea nuevas estrategias diagnósticas para su control que podrían ser aplicadas en zonas de alta y baja endemia, considerando la importante migración desde zonas rurales a las grandes ciudades. Las herramientas sugeridas están disponibles en la mayor parte de los centros asistenciales. Su aplicación sería una contribución concreta al control de la enfermedad de Chagas congénita en nuestro país.

X. CONCLUSIONES

- Los partidores nucleares Tc1-Tc2 y los partidores kinetoplastídicos 121-122, son igualmente sensibles para detectar ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en muestras de sangre periférica.
- Los partidores kinetoplastídicos fueron más específicos en la detección de casos de infección congénita por *Trypanosoma cruzi* que los partidores nucleares.
- PCR con partidores nucleares fue capaz de detectar probables trazas de ADN de *Trypanosoma cruzi* en el 42,5% de la sangre de cordón de RN, hijos de madres chagásicas.
- La parasitemia materna, a la luz de los resultados obtenidos en el estudio mediante PCRk en el binomio madre/pre-parto y RN-nacimiento, no sería un factor relevante en la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*.
- El seguimiento serológico prolongado de los RN, hijos de madres chagásicas, permite establecer si la reacción positiva de PCR con partidores nucleares al nacimiento corresponde a la presencia de ADN de parásitos viables.
- En ausencia de diagnóstico parasitológico directo en el RN, hijo de madre chagásica, la técnica de PCRk es una buena alternativa para el diagnóstico y terapia precoz de Chagas congénito, no obstante ser una técnica compleja y no disponible en toda la zona endémica del país.

XI. BIBLIOGRAFIA

APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRE, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; SAN MARTIN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2008. Guidelines for Chagas disease Part I. Introduction and epidemiology. *Rev Chil Infect* 25(3): 190-193.

APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRE, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; SAN MARTIN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2010. Guidelines for Chagas disease. MINSAL.

ASHALL, F.; YIP-CHUCK, D.; LUQUETTI, A.; MILES, M. 1988. Radiolabeled total parasite DNA probe specifically detects *Trypanosoma cruzi* in mammalian blood. *J Clin Microbiol.* 26:576-578.

AVILA, H. A.; PEREIRA, J.B.; THIEMANN, O.; DE PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 31:2421–2426.

BASSO, B.; MORETTI, E. 1984. Detección del *Trypanosoma cruzi* por hemocultivo en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Med (Bs. Aires)* 44: 41-47.

BLANCO, S.B.; SEGURA, E.L.; CURA, E.N.; CHUIT, R.; TULIAN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, J.F.; GURTLER, R.E. 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health* 5: 293-301.

BOTTO-MAHAN, C; SEPULVEDA, M; VIDAL, M; ACUÑA-RETAMAR, M; ORTIZ, S; SOLARI, A. 2008. *Trypanosoma cruzi* infection in the sylvatic kissing bug *Mepraia gajardoi* from the Chilean Southern Pacific Ocean coast. *Acta Trop* 105(2):166-9.

BRENER, Z. 1985. General Review of *Trypanosoma cruzi*. Classification and Taxonomy. *Rev Soc Bras Med Trop* 18: 1-8.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Segunda Edición. Pág. 127-143.

BRISSE S, VERHOEF J, TIBAYRENC M. 2001. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol* 31: 1218-1226.

BRUTUS, L.; SCHNEIDER, D.; POSTIGO, J.; ROMERO, M.; SANTALLA, J.; CHIPPAUX, J.P. 2008. Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Act Trop* 106(3): 195-199.

CAMPBELL, D.; WESTENBERGER, S.; STURM, N. 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 4: 549-562.

CARLIER, Y.; TORRICO, F. 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: From mechanisms of transmission to strategies for the diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 767-771.

CASTRO, A., LUQUETTI, A.; RASSI, A.; RASSI, G.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 88: 894-900.

CUSNAIDER, C.; GÓMEZ, D.; AMAT, L., AGUILÓ, F.; HERNÁNDEZ, A.; LAILLA, J. 2004. Chagas congénito, ¿es posible en España?. *Ginecol Obst Clin* 5(4): 198-203.

DE CASTILHO, E.; DA SILVA, G. 1976. Maternal Chagas' infection and prematurity. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 18: 258-260.

DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S. P.; BRITTO, C.; VAN HEURVRRSWYN, H.; KIDANE, G.Z.; CARDOSO, A.B.; MULLER, U.; SIMPSON, L.; MOREL, C.M. 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 27: 63-70.

DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTCEH, J.; BURGOS, J.; DIEZ, M.; LEVIN, M.; FAVALORO, R.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A. 2009. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3(4): e419.

FLORES-CHAVEZ, M.; BOSSENO, M.; BASTRENTA, B.; ALCAZAR, J.; HONTEBEYRIE, M.; REVOLLO, S.; BRENIÈRE, S. 2006. Polymerase Chain Reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* i and ii. *Am J Trop Med Hyg* 75(3): 497-501.

GARCÍA, A.; BAHAMONDE, I.; VERDUGO, S.; CORREA, J.; PASTENE, C.; SOLARI, A.; TASSARA, R.; LORCA, M. 2001. Infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi*: situación en Chile. *Rev Méd Chile* 129(3): 330-332.

GOMES, M.; GALVAO, L.; MACEDO, A.; PENA, S.; CHIARI, E. 1999. Chagas disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 60(2): 205-210.

GONZALEZ, A.; PREDIGER, E.; HUECAS, M.; NOGUEIRA, N.; LIZARDI, P. 1984. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3356-3360.

GUHL, F. 2007. Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*. 102: 29-38.

GÜRTLER, R., SEGURA, E., COHEN, J., 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg Infect Dis* 9: 29–32.

HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis* 189(7): 1274-81.

HOWARD, J. 1962. La enfermedad de Chagas congénita. Colección de monografías. Universidad de Chile, Santiago de Chile.

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICAS (INE). 2007. Migración Interna Regional Chile 1992-2002. Instituto Nacional de Estadísticas: 1-51.

JUNQUEIRA, A.C.; CHIARI, E.; WINCKER, P. 1996. Comparison of the Polymerase Chain Reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90(2):129-132.

KIRCHHOFF, L.; VOTAVA, J.; OCHS, D.; MOSER, D. 1996. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 34(5): 1171-1175.

KIRCHHOFF, L. 2009. Chagas Disease (American Trypanosomiasis). eMedicine Specialities <http://emedicine.medscape.com/article/214581-overview>.

MILES, M.; LLEWELLYN, M.; LEWIS, M.; YEO, M.; BALEELA, R.; FITZPATRICK, S.; GAUNT, M.; MAURICIO, I. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitol* 136: 1509-1528.

MOLLINEDO, S.; BRUTUS L.; SCHNEIDER, D.; POSTIGO, J.; SANTALLA, J.; SALAS, A.; CASTILLO, H. MICHEL, G.; DÍAZ, V. 2005. Chagas congénito en Bolivia. *Rev Med - Org Ofic Col Med La Paz* 11(2): 7-18.

MONTAMAT, E.; DURAND, S.; BOCCO, J.L.; DE LUCA D'ORO, G.M.; BLANCO, A. 1999. Identification of *Trypanosoma cruzi* Zymodemes by Kinetoplast ADN Probes. *J Euk Microbiol.* 46 (2):155-159.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.; MATTEI D.; ROMANHA, A.; SIMPSON, L. 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6810-6814.

MORETTI, E.; BASSO, B.; CASTRO, I.; CARRIZO, M.; CHAUL, M.; BARBIERI, G.; CANAL, D.; SARTORI, M.; CARRIZO, R. 2005. Chagas`disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev Soc Bra Med Trop* 38(1): 53-55.

MOSER, D.; KIRCHHOFF, L.; DONELSON, J. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27(7): 1477-1482.

MUÑOZ, P.; THIERMANN, E.; ATÍA, A.; ACEVEDO, C. 1992. Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes. *Bol Chile Ped* 63(4): 196-202.

NOIREAU, F. 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas, en Bolivia. En Cassab, J. A.; Noireau, F.; Guillén. La enfermedad de Chagas en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del Programa de control. La Paz, Bolivia. Ministerio de Salud y Previsión Social 17-47.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). 1994. Chagas disease and the nervous system. *Scientific Publication* N° 547.

RODRIGUES, J. 2007. Chagas disease: what is known and what is hended – A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 102: 113-122.

ROZAS, M.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO, X.; ORTIZ, S.; CATTAN, P.; SOLARI, A. 2005. Short report: *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals from a chagasic area of Chile. *Am J Trop Med Hyg* 73(3): 517-519.

RUSSOMANDO, G.; DE TOMASSONE, M.C.; DE GUILLEN, I.; ACOSTA, N.; VERA, N. ALMIRON, M.; CANDIA, N.; CALCENA, M.F.; FIGUEREDO, A. 1998. Treatment of congenital Chagas`disease diagnosed and followed up by the polymerase. *Am J Trop Med Hyg.* 59(3): 487-491.

SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.C.; BORGONO, J.M.; ROJAS, A.; VALLARROEL, F. 1985. Congenital Chagas' disease in Chile. Longitudinal study of the reproductivity of women with or without Chagas' disease and of some parasitological and clinical parameters of them and their corresponding children. *Bol Chil Parasitol* 40: 24-29.

SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. 1995. Frecuencia de la infección humana por *Trypanosoma cruzi* por grupos de edad y por regiones. *Bol Chile Parasitol* 1(3-4): 84-86.

SCHENONE, H. 1999. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1): 289-294.

SCHIJMAN, A.; ALTCHER, J.; BURGOS, J.; BIANCARDI, M.; BISIO, M.; LEVIN, M.; FREILIJ, H. 2003. Etiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52: 441-449.

SCHIJMAN, A. 2008. Workshop and Symposium. Estandarización y Validación del Uso Clínico de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección de Infección por *Trypanosoma cruzi*, 17-22 de noviembre, Buenos Aires, Argentina.

SILVA, H.; RAMOS, J.; DE FREITAS, J.; DUFFY, T.; BARTHOLOMEU, D.; DE PAULA, R.; CHIARI, E.; VIEIRA, M.; BRASILEIRO, G.; SCHIJMAN, A.; FRANCO, G.; MACHADO, C.; JUNHO, S.; MACEDO, A. 2008. Genetic profiling of *Trypanosoma cruzi* directly infected tissues using nested PCR of polymorphic microsatellites. *Int J Parasitol* 38: 839-850.

SOLARI A.; CAMPILLAY R.; ORTIZ S.; WALLACE A. 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol* 97: 226-233.

STOPPANI, A.; LAGHENS, R. 1989. *Trypanosoma cruzi*, el invasor. Informe sobre Chagas. *Rev Cienc Hoy* 1(2): 45-46.

STRAMER, S.L.; DODD, R.Y.; LEIBY, D.A.; HERRON, R.M.; MASCOLA, L.; ROSEMBERG, L.J.; LAWACZECK, E.; SUNENSHINE, R.H.; KUEHNERT, M.J.; MONTGOMERY, S.; BERN, C.; MOORE, A.; HERWALDT, B.; KUN, H.; VERANI, J.R. 2007. Blood donor screening for Chagas disease-United States, 2006-2007. *MMWR* 56: 141-143.

TARLETON, R.L.; REITHINGER, R.; URBINA, J.A.; KITRON U; GÜRTLER, R.E. 2007. The challenges of Chagas disease-grim outlook or glimmer of hope. *Plos Med* 4 (12): 332.

TARLETON, R.L.; ZHANG, L. 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 15: 94-9.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. 1988. Isoenzyme variability of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' Disease: Genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.

TIBAYRENC, M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85-104.

TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, M.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. 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.

VIRREIRA, M.; TORRICO, F.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA C.; SOLANO M.; CARLIER Y.; SVOBODA M. 2003. Comparison of polimerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 68(5):574-582.

VIRREIRA, M.; ALONSO-VEGA, C.; SOLANO, M.; JIJENA, J.; BRUTUS, L.; BUSTAMANTE, Z.; TRUYENS, C.; SCHNEIDER, D.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M. 2006a. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 75(5): 871-879.

VIRREIRA, M.; MARTINEZ, S.; ALONSO-VEGA, C.; TORRICO, F.; SOLANO, M.; CRUZ, M.; PARRADO, R.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y.; SVOBODA, M. 2006b. Short report: Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 75(6): 1082-1084.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2000. Chagas Disease interrupted in Chile. *TDR News* 61:10.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.; BRIONES, M.; CAMPBELL, D.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.; MACHADO, C.; MILES M.; ROMANHA, A.; STURM, N.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7):1051-4.

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 Chile* 126(3): 265-70.

ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; OSUNA, A.; ROJAS, A.; LOPEZ, B.; SÁNCHEZ, G. 2004. Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diag Microbiol Infect Dis* 48(4): 253-257.

ANEXO

Muestras sometidas a la evaluación de partidores kinetoplastídicos y nucleares en la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), según grupo de estudio.

GRUPO I		GRUPO II		GRUPO III		GRUPO IV		GRUPO V	
679	859	680	860	1131	402	1132	403	BINOMIOS	
839	1109	840	1111	1139	814	1140	814-h	Madre	RN
842	1310	843	1311	1143	183	1144	184	1572	1573
813-M	1312	813-H	1313	1302	652	1303	653	1576	1577
816-M	1333	816-H	1334	1304	654	1305	655	1582	1583
817-M	1346	817-H	1347	1314	44	1315	45	1584	1585
646	1348	647	1349	1320	666	1321	667	1595	1596
674	1350	675	1351	1365	181	1366	182	1605	1606
1016	1367	1017	1368	1428	34	1429	35	1617	1618
1335	AC	1336	1121	1430	173	1431	174		