UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

RENDIMIENTO DEL XENODIAGNÓSTICO Y REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA EN LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN DEYECCIONES DE TRIATOMINOS

CRISTIÁN MAURICIO ROCHA MIQUELES

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

PROFESOR GUÍA: DR. WERNER APT BARUCH

Financiado por: Proyectos DI SAL 03/06-2 y FONDECYT 1040731

SANTIAGO-CHILE
2005

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

RENDIMIENTO DEL XENODIAGNÓSTICO Y REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA EN LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN DEYECCIONES DE TRIATOMINOS

CRISTIÁN MAURICIO ROCHA MIQUELES

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

NOTA FINAL: ……

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA :	DR. WERNER APT BARUCH	…….	…….
PROFESOR CONSEJERO :	HECTOR ALCAINO CONTADOR	…….	…….
PROFESOR CONSEJERO :	INES ZULTANAY ALFARO	…….	…….

SANTIAGO-CHILE
2005

INDICE

	Página
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	i
RESUMEN	ii
INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA	4
A. Enfermedad de Chagas	4
a. Generalidades	4
b. Epidemiología	5
c. Diagnóstico serológico y parasitológico. Generalidades	6
d. Tratamiento quimioterapéutico	8
B. *Trypanosoma cruzi*	10
a. Generalidades	10
b. Kinetoplasto	12
c. Genética	13
d. Antecedentes epidemiológicos de las poblaciones de *T. cruzi* circulantes en Chile	15
C. Amplificación de DNA mediante PCR	16
a. Desnaturación	16
b. Alineación de partidores de extensión	16
c. Extensión de partidores	17
D. Aplicación de XD en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	17
E. Aplicación de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	18

HIPOTESIS 21

OBJETIVO GENERAL 21

OBJETIVOS ESPECIFICOS 21

MATERIALES Y METODOS 22

A. Muestra en estudio 22
B. Método de obtención de triatominos 22
C. Xenodiagnóstico 22
D. Deyecciones de triatominos 23
E. PCR 23
F. Análisis de resultados 24
G. Recolección de información 24
H. Análisis estadístico de resultados obtenidos 24

RESULTADOS 25

A. Positividad global 25
B. Rendimiento de cajas aplicadas en el XD 28
C. Concordancia entre resultados de XD y PCR 28
D. Complementariedad entre resultados de XD y PCR 29
E. Precocidad de resultados de PCR en la detección de *T. cruzi* 30
F. Continuidad de resultados positivos del XD 31

DISCUSION 33

CONCLUSIONES 41

BIBLIOGRAFIA 42

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* 12

Figura 2. Red de ADN kinetoplastídico de *Trypanosoma cruzi* 13

Figura 3. Amplificación de kADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en deyecciones de triatominos utilizados en el XD 26

Figura 4. Amplificación de kADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en deyecciones de triatominos utilizados en el XD 27

Figura 5. Amplificación de kADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en deyecciones de triatominos utilizados en el XD 27

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Positividad de PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 25 chagásicos crónicos XD positivo (Grupo I), según periodos de incubación 26

Tabla 2. Rendimiento de las cajitas de XD aplicadas a 25 chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I) 28

Tabla 3. XD y PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 50 individuos chagásicos crónicos, según período de incubación. Concordancia de resultados. 29

Tabla 4. XD y PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 50 individuos chagásicos crónicos, según período de incubación Complementariedad de resultados. 30

Tabla 5. PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 25 individuos chagásicos crónicos XD positivo (Grupo I). Precocidad de resultados. 31

Tabla 6. XD y PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 25 chagásicos crónicos, según periodo de incubación. Secuencia de resultados. 32

LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenosina
ATP	adenosin trifosfato
BSA	bovin serum albumin
C	citosina
DNA	ácido desoxiribonucléico
dATP	dexosi adenosin trifosfato
dCTP	dexosi citosin trifosfato
dGTP	dexosi guanidin trifosfato
dNTP	desoxi nucleótidos trifosfato
dTTP	dexosi timidin trifosfato
dUTP	desoxi uridin trifosfato
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
G	guanidina
HAI	Hemaglutinación Indirecta
HCl	ácido clorhídrico
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IgG	inmunoglobulina G
IgM	inmunoglobulina M
kADN	ADN kinetoplastídico
kpb	kilo pares de bases
$MgCl_2$	cloruro de magnesio

min	minutos
ml	mililitro
mM	mili molar
N	norte
$(NH_4)_2SO_4$	sulfato de amonio
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
S	Sur
SPSS	System Package Statistical Science
T	timidina
TRIS	TRIS hidroxi metil amino metano
U	unidades enzimáticas
µg	microgramo
µl	microlitro
µm	micrometro
µM	micromolar
XD	xenodiagnóstico

RESUMEN

La enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública en el continente americano. De acuerdo a la OMS existirían 18.000.000 personas con esta parasitosis. Brasil con 5.000.000 y Argentina con 2.200.000 infectados son los países más afectados. En Chile se estiman que existen actualmente 200.000 chagásicos crónicos.

Existen características clínicas regionales de la enfermedad de Chagas, siendo la cardiopatía y las megaformaciones las principales manifestaciones en la etapa crónica.

El diagnóstico es abordado desde el punto de vista clínico–epidemiológico y se orienta en función de la etapa de la infección. En los casos agudos, debido a la elevada parasitemia, los métodos de elección son parasitológicos y en la etapa crónica, por las fluctuantes y bajas parasitemias, la detección de *T. cruzi* es más compleja. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en sangre periférica de individuos chagásicos, ha permitido aumentar la sensibilidad diagnóstica. Recientemente, se ha aplicado PCR en deyecciones de triatominos alimentados mediante xenodiagnóstico (XD) en chagásicos crónicos sometidos a tratamiento quimioterapéutico.

Con el fin de conocer la sensibilidad y precocidad de la detección de kDNA de *T.cruzi* en deyecciones de triatominos alimentados mediante XD en pacientes con enfermedad de Chagas crónica, a 25 infectados con XD (+) (Grupo I) y 25 infectados con XD (-) (Grupo II), se aplicó PCR al pool de deyecciones de triatominos incubados durante 30, 60 y 90 días. En todos los casos con XD (+) se detectó la banda específica de 330 pb. Mientras a los 60 días el XD era positivo en el 84% de los casos, PCR tuvo un 100% de

positividad. En el Grupo II, de chagásicos con XD (-) a los 30, 60 y 90 días, 9 casos (36%) tuvieron PCR positivo. Los resultados permiten concluir que PCR aplicado en deyecciones de triatominos es un herramienta más precoz para detectar *T. cruzi* que el XD, ya que a los 30 días, XD y PCR tienen un 44% y un 92% de positividad, respectivamente. El 100% de los casos es pesquisado mediante PCR a los 60 días, mientras que el XD necesita 90 días para obtener el mismo resultado. El XD actúa como un medio de cultivo biológico para amplificar *T.cruzi*, lo que permite aplicar PCR en las deyecciones, por esta razón, ambas técnicas son complementarias.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una zoonosis parasitaria cuyo agente etiológico es el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Constituye uno de los principales problemas de salud pública en Latinoamérica, con alta implicancia médica, social y económica (Moncayo, 1993). Afecta a un importante número de personas y animales domésticos, sinantrópicos y silvestres. Brasil con 5.000.000 individuos infectados, Argentina con 2.500.000, seguidos de Bolivia, Chile y Perú, representan una muestra de la importancia de esta parasitosis. Es importante consignar que, en Estados Unidos, existen entre 25.000 y 100.000 inmigrantes latinoamericanos con esta afección (WHO, 2000). Las condiciones aptas para su transmisión se ubican entre las latitudes 42º N, sur de California y 43º S en Argentina. En Chile, el área endémica se extiende desde el paralelo 18º en el norte (I Región), hasta el paralelo 34º (VI Región). Las regiones rurales y periurbanas de la III y IV Región son consideradas hiperendémicas y se estima que actualmente existen alrededor de 150.000 a 200.000 infectados (Apt *et al*., 2003).

T. cruzi es transmitido al hombre y a otros mamíferos por insectos hematófagos, popularmente conocidos como vinchucas (Noireau, 1999). En Chile, existen dos especies de triatominos vectores, *Triatoma infestans* que participa en el ciclo doméstico de trasmisión y *Mepraia spinolai* en el ciclo silvestre, éste último, autóctono de nuestro país (Canals *et al*., 2000). Actualmente en Chile, el riesgo de infección vectorial ya no sería relevante, dado que los programas de control han permitido certificar la interrupción vectorial de la enfermedad (WHO, 2000). De esta manera, otras vías de infección, tales como la transplacentaria y

transfusional adquirirían mayor importancia en la epidemiología de la enfermedad de Chagas (Schenone *et al*., 2003).

La enfermedad de Chagas tiene un curso clínico variable, que va desde una infección asintomática hasta una enfermedad crónica severa con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal. Esta diversidad clínica, ha sido atribuida a variaciones en la respuesta inmune del hospedador, como a la heterogeneidad genética del parásito (Brener *et al*., 2000).

En el hombre, el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* debe ser abordado desde el punto de vista clínico-epidemiológico y confirmado por el laboratorio, mediante el cual la búsqueda del parásito o de la respuesta inmune del hospedero infectado, confirma o descarta el diagnóstico inicial. Los exámenes de laboratorio deben estar orientados en función de la fase de infección y es así como, en casos de sospecha de fase aguda donde es característica una elevada parasitemia, tienen prioridad los exámenes parasitológicos, mientras que la sospecha de enfermedad de Chagas crónica, orienta a la pesquisa de anticuerpos específicos mediante técnicas serológicas convencionales. Los métodos parasitológicos tienen menor sensibilidad en la etapa crónica de la afección, debido a que ésta se caracteriza por presencia de escasos nidos de formas amastigotas en tejidos y lenta reproducción de ellos, lo que se traduce en bajas y esporádicas parasitemias. Una herramienta ampliamente utilizada en el diagnóstico parasitológico de chagásicos crónicos es el xenodiagnóstico (XD), específico en Chile para diagnóstico de *T. cruzi*, puesto que en nuestro medio no existe *Trypanosoma rangeli*, tripanosomátido capaz de desarrollarse en los vectores triatominos utilizados en este método. Por este motivo, XD es en la actualidad el “gold standard” de las técnicas parasitológicas, con una sensibilidad máxima de 69.1%, en la etapa crónica, utilizando dos cajas con siete ninfas de tercer estadio de *T. infestans*

cada una, durante tres días. El resultado, se obtiene del análisis microscópico de las deyecciones de los triatominos a los 30, 60, 90 o 120 días según técnica descrita (Schenone, 1999).

La determinación de la infección por *T. cruzi* en triatominos vectores es un elemento de evaluación de los programas de control para reducir la transmisión del organismo a humanos. Tradicionalmente, *T. cruzi* ha sido detectado en esos insectos por examen microscópico del contenido intestinal o deyecciones. La sensibilidad de este laborioso proceso no ha sido aún definida debido a la carencia de un marcador que pueda ser comparado con el examen microscópico (Shikanai *et al*., 1996)

Desde hace algún tiempo, la técnica de PCR se ha aplicado como herramienta de diagnóstico de la enfermedad y en el seguimiento de individuos tratados, evidenciando excelente sensibilidad, especificidad y rapidez para amplificar diferentes secuencias del genoma de *T. cruzi* (Soto, 1998).

En esta investigación, se analiza el rendimiento del XD y PCR a los 30, 60 y 90 días en la detección de *T. cruzi* en deyecciones de triatominos alimentados sobre individuos chagásicos crónicos. Postulamos que PCR puede ser utilizado para acelerar la detección del parásito en pacientes que cursan la fase crónica de la afección. Al mismo tiempo, que PCR constituye una herramienta complementaria al XD, dada la eficiente capacidad de este último método para amplificar en forma natural *T. cruzi*.

REVISION BIBLIOGRAFICA

1.-Enfermedad de Chagas

a.- Generalidades

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es la infección de mamíferos y de triatominos producida por el protozoo flagelado, *Trypanosoma cruzi*. El huésped humano puede infectarse por varios mecanismos, de los cuales el principal y de mayor importancia epidemiológica es la transmisión a través de las deyecciones de triatominos parasitados. Este es el mecanismo natural, causante de la llamada "infección adquirida". La infección transfusional ha sido considerada como la segunda en importancia, seguida por la infección congénita o transplacentaria (Noireau, 1999; Atías, 2000). En el hombre, la infección afecta, en grado variable, diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y el tubo digestivo (Brener *et al*., 2000).

La infección humana por *T. cruzi* presenta un período de incubación que varía entre los 4 a 10 días, el que es generalmente asintomático. Posteriormente, sobreviene la fase aguda donde la parasitemia es relativamente alta. En esta fase es frecuente la aparición de una pequeña lesión en el sitio de la picadura denominada chagoma de inoculación, que si está a nivel de la conjuntiva del ojo, puede producir un edema duro bipalpebral unilateral con adenopatia preauricular llamado "signo de Romaña". En esta fase, los pacientes pueden presentar fiebre, anorexia, diarrea y vómitos, hepatoesplenomegalia, edemas generalizados, adenopatías difusas e inclusive anormalidades electrocardiográficas y/o radiográficas que indican una miocarditis aguda. Cuatro a ocho semanas después de la fase aguda se inicia la fase indeterminada que se caracteriza por la ausencia de síntomas, extendiéndose por años o manteniéndose por tiempo indefinido. Recientemente, se ha subdividido la etapa crónica

de la enfermedad de Chagas en período crónico reciente, que estaría formado por individuos chagásicos menores de 12 años y en período crónico tardío, que se caracteriza por parasitemia subpatente y se puede presentar en forma de miocardiopatía dilatada, dilatación de segmentos del tubo digestivo (megaesófago y megacolon, principalmente) o afecciones al sistema nervioso (OPS, 1999). Estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que aproximadamente un 27% de los infectados sufrirá daño cardíaco, un 6% evolucionará hacia el desarrollo de megavísceras y un 3% sufrirá daño neurológico. Un 64% de los infectados no desarrollará sintomatología clínica (WHO, 1991; Noireau, 1999).

b.- Epidemiología

La enfermedad de Chagas presenta una amplia distribución geográfica en Centro y Sudamérica, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica, en el paralelo 35° latitud N, hasta Chile y Argentina (Apt y Reyes, 1990).

En Chile, el área endemoenzoótica se extiende entre el paralelo 18° por el norte (I Región) y el paralelo 34° por el sur, es decir, VI Región (Atias y Apt, 1991), siendo las regiones III y IV consideradas hiperendémicas (Schenone *et al*., 1991a). Se estima que la infección humana por *T. cruzi* en la zona endémica tiene una prevalencia serológica del 16.7% en sectores rurales-periurbanos y un 1.9% en sectores urbanos de esta áreas (Schenone *et al.*, 1995a), mientras que en donantes de sangre se ha estimado una prevalencia del 2,7% (Contreras *et al*., 1992).

Estos antecedentes epidemiológicos, sentaron las bases para la planificación de programas de eliminación del vector y control de donantes de sangre en zonas endémicas.

Es así, como posterior al desarrollo de la Iniciativa de los Países del Cono Sur (OPS, 1992), se certificó recientemente a Chile como el segundo país que ha interrumpido la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas (WHO, 2000).

En el año 1982, se determinó una prevalencia de infección chagásica del 5,4% en un total de 2509 niños menores de 5 años. En el mismo grupo etáreo, se obtuvo una prevalencia del 0,4% al evaluar 5069 niños en el año 1999 (Lorca *et al*., 2001).

Respecto de la tasa de infestación domiciliaria por insectos triatominos, en 1999 se determinó una tasa del 0,14%, es decir, un descenso del 99,8% comparada con la existente en el año 1996, lo que evidencia que la infección adquirida a través del vector ya no sería el principal mecanismo de transmisión. Finalmente, respecto al control de la infección en donantes de bancos de sangre, se ha informado una cobertura del 100% (WHO, 2000).

c.- Diagnóstico serológico y parasitológico. Generalidades.

Los primeros anticuerpos detectados en el curso de la infección por *T. cruzi* pertenecen a la clase IgM, siendo reemplazados gradualmente por IgG a medida que progresa la infección (Noireau, 1999). En Chile, el diagnóstico serológico se realiza rutinariamente mediante hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (Zulantay *et al.*, 1998). La sensibilidad de estas técnicas depende de la fase de la enfermedad y del tipo de inmunoglobulina estudiada. De este modo, en la fase crónica, la pesquisa de IgG alcanza una sensibilidad entre 95-100%, no así en la fase aguda en que IgM presenta una mayor sensibilidad. La OMS recomienda efectuar al menos dos técnicas serológicas convencionales para confirmar la infección (Noireau, 1999, Brener *et al.*, 2000).

Es importante señalar que si bien las técnicas de serología convencional presentan una buena sensibilidad, no permiten determinar la etapa de la infección ni la evolución clínica, así como tampoco permiten realizar estudios de evaluación de eficacia quimioterapéutica debido a que permanecen persistentemente positivas en el tiempo, aún cuando las pruebas parasitológicas resulten negativas (Cançado, 1999).

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas 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 y xenodiagnóstico (WHO, 1991)

El estudio parasitológico de la infección chagásica en nuestro país, se ha efectuado principalmente a través de XD, debido a la carencia de otros métodos más eficaces para aislar *T. cruzi* desde la sangre de individuos infectados (Schenone *et al.*, 1995b). Una de las desventajas del XD, es el período que transcurre para obtener un resultado, el que varía entre 30 y 120 días (WHO, 1991; Noireau, 1999). Dado que en el período crónico de la enfermedad la parasitemia disminuye a niveles subpatentes, la utilidad de las pruebas directas se ve limitada, siendo en esta etapa los métodos de elección aquellos que detecten anticuerpos específicos contra el parásito.

Desde hace algunos años, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido introducida como método de diagnóstico parasitológico en las diferentes etapas de la enfermedad de Chagas, permitiendo no solamente reconocer la presencia de *T. cruzi* en la sangre sino también caracterizar las cepas circulantes (Noireau, 1999).

d.- Tratamiento quimioterapéutico

La quimioterapia específica para enfermedad de Chagas es de reciente aplicación. Al respecto, muchas son las investigaciones que se han realizado para encontrar drogas apropiadas que muestren por una parte, alta actividad tripanocida y muy baja o nula toxicidad para el hospedero (Apt, 1999; Brener *et al.*, 2000). De acuerdo a la OMS, la droga ideal debe cumplir con los siguientes requisitos: lograr cura parasitológica de casos agudos y crónicos, ser eficaz pocas o en dosis única, ser accesible a los pacientes, carecer de efectos colaterales y teratogenicidad, no requerir hospitalización y no causar resistencia parasitaria (Apt *et al*., 1994; Rodríguez Coura y de Castro, 2002).

Actualmente, el tratamiento quimioterapéutico de la enfermedad de Chagas se recomienda en individuos que cursan con fase aguda, infección transplacentaria, fase crónica reciente y fase indeterminada. Por el contrario, el tratamiento no es recomendado en pacientes crónicos con Core bovis e insuficiencia cardiaca terminal. Muchas son las drogas que han demostrado acción in *vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*, pero las únicas que se pueden aplicar al hombre de acuerdo a normas éticas y clínicas son Benznidazol y Nifurtimox (OPS, 1999; Apt, 1999). No obstante ello, en la actualidad se descontinuó la elaboración de Nifurtimox por razones comerciales y el Benznidazol existe en forma restringida (Apt, 1999). Ambas drogas presentan una alta toxicidad y serios efectos colaterales producto de sus mecanismos de acción.

Investigaciones realizadas por Apt *et al*., (1998) en un grupo de 404 pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con Itraconazol o Alopurinol, permitieron evidenciar cura parasitológica en el 44% de los pacientes tratados con Alopurinol y 53% de aquellos tratados con Itraconazol. De acuerdo a lo descrito en la literatura, ambas drogas,

especialmente Itraconazol, son parcialmente eficaces para el tratamiento de la infección chagásica crónica, demostrando además ser bien toleradas, constituyéndose en una buena alternativa terapéutica (Apt *et al*, 1998; Apt, 1999; Apt *et al*, 2003).

En la fase aguda y crónica reciente, el seguimiento post-terapia se realiza principalmente a través de evaluación clínica, parasitológica (hemocultivo y/o XD) y serológica. La negativización permanente de estos parámetros por un período prolongado, permite establecer la curación del individuo (Apt, 1999). En la fase crónica reciente, la negativización de la serología convencional se obtiene años después de finalizado el tratamiento (OPS, 1999).

En la fase crónica de la enfermedad de Chagas, por el contrario, no se cuenta hasta hoy con un criterio fidedigno de curación. Los anticuerpos anti- *T. cruzi* detectados por serología convencional, persisten por tiempo indefinido después de la eliminación del parásito circulante (Cançado, 1999) y la utilización de XD como herramienta única de evaluación parasitológica, se ve limitada por su bajo rendimiento. Bajo estas condiciones, un resultado de XD negativo no se puede interpretar como curación parasitológica (Brener *et al.*, 2000). Apt (1999), sugiere como criterio de curación en la enfermedad de Chagas crónica la negativización post-terapéutica de dos o más parámetros tales como XD, PCR, hemocultivo, anticuerpos líticos, mejoría de la condición clínica y reversión de las alteraciones electrocardiográficas. Por otra parte, se ha recomendado evaluación anual por serología convencional, aún cuando la serología puede disminuir sus títulos y aún tornarse negativa después de 10 o más años de seguimiento (OPS, 1999).

B.-*Trypanosoma cruzi*

a.- Generalidades

Trypanosoma cruzi es un protozoo mastigóforo perteneciente a la Familia Trypanosomatidae, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos e insectos vectores reduvídeos de la Familia Triatomidae (Atías, 2000). Los parásitos son transmitidos vía deposiciones infectadas que el vector elimina al momento de alimentarse (Brener *et al.*, 2000). Los hospederos mamíferos pueden ser el hombre y algunos animales domésticos (caninos, felinos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos y conejos) o silvestres (roedores, primates, marsupiales y edentados) (Wendel *et al.*, 1992).

Los vectores biológicos de *T. cruzi* son insectos hematófagos limitados a invertebrados del Orden Hemíptera, familia Reduvidae, subfamilia Triatominae que incluye a más de 100 especies. De los 16 géneros distintos que son susceptibles a la infección por *T. cruzi*, los más importantes son *Pastrongylus, Rhodnius y Triatoma* (Goble 1970; Pinto Días, 1990). Los triatominos vectores de *T. cruzi* están distribuidos entre las latitudes 42° Norte (sur de California) y la latitud 43° Sur (norte de Argentina y Chile) (PHAO, 1994).

En Chile, *Triatoma infestans* representa la especie de mayor importancia epidemiológica para la enfermedad de Chagas por su adaptación al ámbito humano, alimentándose del hombre y sus animales domésticos, manteniendo el ciclo doméstico de la enfermedad. El otro vector, *Mepraia spinolai* (sinonimia: *Triatoma spinolai*), sólo se ha descrito en Chile y habita en zonas silvestres especialmente canteras, guaneras de aves, cuevas de animales y ocasionalmente en corrales y pircas periantrópicas y rara vez en la vivienda humana. Su valor epidemiológico radica en la mantención del ciclo silvestre de la enfermedad (Canals *et al.*, 2000).

En sus diversos hospederos y en medios de cultivo *T. cruzi* presenta tres aspectos morfológicos fundamentales: tripomastigoto, de aspecto fusiforme, de unos 20 μm de largo, con citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Posee un kinetoplasto subterminal posterior al núcleo, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior ; epimastigoto, de aspecto fusiforme, de unos 20 μm de largo, con un kinetoplasto localizado por delante del núcleo, o a su nivel, y presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre; amastigoto, elemento redondeado de unos 2 μm de diámetro, en el cual se distingue el núcleo y el kinetoplasto, aparentemente aflagelado, con un corto flagelo no emergente visible al microscopio electrónico (Brener, 1985).

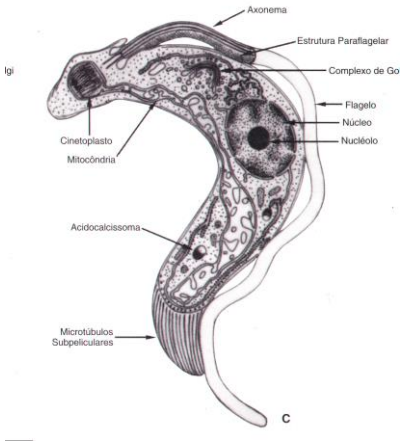
Los triatominos se infectan al ingerir sangre de mamíferos que contienen tripomastigotos, los que se multiplican activamente como epimastigotos por fisión binaria en el intestino medio del insecto y, al cabo de 15-30 días, se eliminan en forma de tripomastigotos metacíclicos a través de las deyecciones emitidas por el insecto infectado al momento de picar a un nuevo mamífero. Las formas tripomastigotes infectantes atraviesan la piel por el sitio de la picadura hasta penetrar las células del huésped vertebrado donde se diferencian a amastigotes, los que se multiplican hasta romper la célula huésped infectando nuevas células o invadiendo sangre periférica. El ciclo biológico se completa cuando los tripomastigotos son ingeridos por los triatomas hematófagos (Brener *et al*., 2000).

T. cruzi se compone de una amplia variedad de poblaciones circulantes en insectos vectores, animales vertebrados que actúan como reservorios del parásito y en el hombre. Esta amplia diversidad podría implicar características biológicas distintivas entre las poblaciones estudiadas, las cuales incluirían efectos patológicos, inmunológicos,

vulnerabilidad a drogas y vacunas y otras características de importancia médica (Dvorak, 1984; Ayala, 1993). Esto ha motivado la generación de diversas líneas de investigación sobre sus propiedades biológicas, que incluye curvas de parasitemia, respuesta inmune, sensibilidad a drogas y virulencia en modelos experimentales (Solari *et al.,* 1998).

Figura 1

Morfología trypomastigote de *Trypanosoma cruzi*



b.- Kinetoplasto

T. cruzi, como otros miembros de la Familia Trypanosomatidae, se caracteriza por poseer una única mitocondria (Brener *et al.,* 2000). El ADN kinetoplastídico (kADN) representa cerca del 20% del ADN total del parásito. Está formado por minicírculos (1.4 kpb) y maxicírculos (1.6 kpb) de ADN encadenados formando una compleja red compacta (Riou y Pautrizel, 1969). Existen al menos 50 copias idénticas de maxicírculos que son similares al ADN mitocondrial de los eucariontes superiores y codifican RNAs ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP en la mitocondria (Simpson, 1987). Los minicírculos existen en número variable (entre 3000 y 30000 copias), pudiendo haber

heterogeneidad de secuencia entre los minicírculos de cada clon de *T. cruzi*. Cada minicírculo representa cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre si y con un tamaño cercano a las 120 pb y representan los orígenes de replicación de los minicírculos (Kitchin *et al.*, 1985). Así también, contiene cuatro regiones hipervariables en secuencias de tamaño cercano a 250 pb (Ray, 1989; Sheline y Ray, 1989).

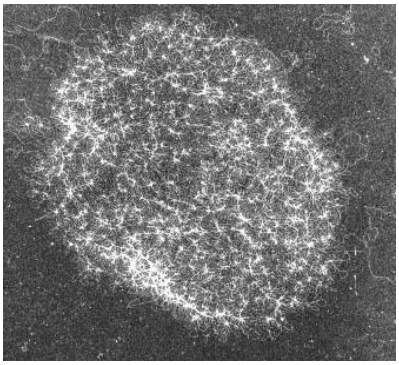


Figura 2. Red de ADN kinetoplastídico de *Trypanosoma cruzi*

c.- Genética

Los genomas de *T. cruzi* están situados en dos compartimientos celulares bien definidos, núcleo y kinetoplasto (Brener *et al.*, 2000). Estudios de aloenzimas o fragmentos de restricción de kADN han mostrado un marcado polimorfismo en poblaciones naturales de *T. cruzi* (esquizodemas). Por otra parte, análisis de isoenzimas mediante electroforesis (zimogramas) han permitido la clasificación de parásitos aislados de diferentes hospederos en categorías llamadas zimodemas (Tibayrenc y Ayala, 1988). Un zimodema incluye todos los parásitos que muestran patrones idénticos para un grupo de enzimas. La caracterización de diferentes poblaciones de parásitos ha sido también realizada por estudios del

polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción de kADN (RFLP) (Sturm *et al.*, 1989). Los parásitos que exhiben el mismo patrón de RFLP pertenecen a un mismo esquizodema. Diferentes grupos de investigadores han reportado una estrecha correlación entre zimodemas y esquizodemas, sugiriendo que los genes estructurales nucleares que codifican enzimas y el ADN extranuclear (kADN) han tenido una evolución paralela (Montamat *et al.*, 1999).

Miles *et al*., (1977, 1978) estudiando cepas de *T. cruzi* en el norte de Brasil, describe la presencia de tres zimodemas (Z1, Z2 y Z3). Los parásitos Z1 y Z3 fueron encontrados en el ciclo selvático y en pocos casos agudos humanos, mientras los parásitos Z2 fueron encontrados en forma restringida en el ciclo doméstico de transmisión. Luego de extensos estudios de genética de poblaciones de *T. cruzi* en diversos países de Sudamérica, surgió la teoría de estructura clonal para las poblaciones de este parásito. Para este propósito se incrementó la cantidad de sistemas isoenzimáticos estudiados, Tybayrenc *et al*., (1986) y Tibayrenc y Ayala (1988), analizan los perfiles isoenzimáticos de 645 muestras de *T. cruzi* aislados de una variedad de hospederos vertebrados e invertebrados con una amplia distribución geográfica, observándose una amplia variedad genética. Ellos identifican al menos 43 zimodemas distintos (Z1 a Z43), correspondiente a clones naturales de *T. cruzi*.

Otras investigaciones han empleado técnicas de hibridación de ADN y análisis de esquizodemas (generación de fragmentos de kADN por el uso de enzimas de restricción) en poblaciones de *T. cruzi* en Chile y otros países de América del Sur. Estos estudios concuerdan con la caracterización mediante isoenzimas y apoyan la hipótesis de clonalidad, lo que implica que los marcadores específicos del kADN y del ADN nuclear son transmitidos en conjunto a la progenie (Solari *et al.*, 1992, Venegas *et al*., 1997). Tibayrenc

y Ayala, (1988) determinan la existencia de clones muy cercanos genéticamente, como también la amplia distancia genética que los separa de otros. El número de clones en el Taxón *T. cruzi* no es limitado, un incremento del número de cepas estudiadas y la resolución de las técnicas empleadas permitirán detectar mayor variabilidad (Breniere *et al.,* 1999).

Tibayrenc y Ayala (1988) han analizado la evolución de *T. cruzi* mediante el análisis de zimodemas. Asumiendo que el parásito es diploide, ellos han asignado un correspondiente genotipo a cada uno de los fenotipos observados y aplican un criterio de genética de poblaciones para evaluar los resultados. Observaron la ausencia de segregación alélica y de recombinación génica, indicando que la reproducción sexual es muy restringida y concluyen que las poblaciones circulantes de *T. cruzi* tienen básicamente un estructura clonal (Montamat *et al.,* 1999) y el intercambio genético ocurriría especialmente en el ciclo selvático (Carrasco *et al.,* 1996).

La amplia diversidad evidenciada por *T. cruzi* podría implicar características biológicas distintivas entre las poblaciones estudiadas, las cuales incidirían en los eventuales efectos patológicos, vulnerabilidad a drogas y vacunas y otras características de importancia médica (Ayala, 1993; Fonseca y Romanha, 1999).

d.- Antecedentes de las poblaciones de *T. cruzi* circulantes en Chile

En Chile circulan fundamentalmente los clones 19, 20, 32, 33 y 39, llamados clones mayores por ser muy frecuentes en extensas regiones de Latinoamérica (Tibayrenc y Breniere, 1988). En Chile los clones 19 y 20 se encuentran preferentemente en el ciclo silvestre, es decir, en el hábitat de *M. spinolai* y de animales silvestres (Frías *et al*., 1998).

Por el contrario stocks de *T. cruzi* pertenecientes a este mismo grupo fueron evidenciados en *T. infestans*, vector exclusivo en la II Región del país (González *et al.*, 1995). Por su parte, los clones 32, 33 y 39 circulan de preferencia en el ciclo doméstico, o sea, son transmitidos por *T. infestans* y se encuentran en el hombre, aunque el clon 39 es el más frecuente (Solari *et al.*, 1992) y parece representar casi la única entidad pesquisada en sectores rurales de la Región Metropolitana (Muñoz *et al.*, 1994).

C.- Amplificación de DNA mediante PCR

La técnica de PCR es un método enzimático de síntesis de múltiples copias de un segmento específico de ADN. Se asemeja al proceso natural de replicación de ADN donde el número de moléculas se duplica después de la repetición de tres pasos sucesivos que forman un ciclo bajo condiciones de temperaturas controladas:

a.- Desnaturación

La molécula de ADN de cadena doble usada como molde, es desnaturada por incubación a alta temperatura. Las hebras disociadas permanecen libres en solución hasta que la temperatura descienda lo suficiente como para permitir la alineación de los oligonucleótidos usados como partidores.

b.- Alineación de partidores de extensión

Los partidores de extensión son definidos como el par de oligonucleótidos sintéticos que se alinean a sitios vecinos a la región a ser amplificada. Cada partidor se alinea solo a una de las hebras de ADN, ya que poseen secuencias diferentes que no los hacen complementarios el uno del otro.

c.- Extensión de partidores

Es la extensión del complejo partidor-hebra de ADN mediante la enzima DNA polimerasa. Esta extiende los partidores en su extremo 3'. Puesto que los extremos 3' de los partidores se enfrentan, ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento llevan a una síntesis exponencial de copias del segmento específico comprendido entre los extremos 5' de los partidores, conocido también como "producto corto". El empleo de una enzima termoestable, purificada desde *Thermus aquaticus* simplifica el procedimiento al no requerir la adición de enzima fresca después de cada paso de desnaturación (Oste, 1988).

D.- Xenodiagnóstico. Aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El XD es un procedimiento sofisticado desarrollado por Brumpt (1914), que utiliza al insecto vector 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, constituido por 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* (Schenone, 1999).

El XD es considerado una buena herramienta para el diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas, tanto para la selección de pacientes para terapias específicas como para su evaluación. También muestra utilidad para la evaluación de la parasitemia y su relación con las condiciones clínicas de la enfermedad. El resultado del examen de XD incrementa en directa proporción con el numero de cajitas usadas, es por esto que se aconseja el uso de XD seriado, en especial para el diagnóstico parasitológico de individuos con enfermedad de Chagas crónica (Schenone, 1999).

Este método presenta una mayor sensibilidad en individuos jóvenes y con infección reciente. De esta manera, se han reportado sensibilidades en grupos etareos menores de 10 años del 60,8% y 75% (Schenone *et al.*, 1995a; Solari *et al.*, 1998). En la infección crónica, en cambio, se ha reportado una sensibilidad de 49,3% (Schenone *et al.*, 1974). Su rendimiento aumenta significativamente a medida que aumenta el número de cajas utilizadas (Schenone *et al.*, 1991b).

En Chile, el XD ha sido una técnica ampliamente utilizada para efectos diagnósticos, epidemiológicos y quimioterapéuticos y son innumerables los reportes al respecto (Schenone, 1999).

E.- Aplicación de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ha permitido optimizar el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* amplificando ADN desde regiones altamente repetidas del genoma de *T. cruzi*, constituyéndose en una promisoria herramienta para ser utilizada en el diagnóstico de la infección (Wirth *et al*., 1989; Moser *et al*., 1989; Avila *et al.*, 1991; Britto *et al*., 1993; Junqueira *et al*., 1996). El ADN nuclear y kinetoplastídico de *T. cruzi* contiene varias

secuencias repetitivas que son de mucha utilidad como blanco para la técnica de PCR, abundantes y fáciles de purificar desde la célula tripanosómica (Junqueira *et al.,* 1996). Un fragmento de aproximadamente 330 pb de los minicírculos del kinetoplasto de *T. cruzi* es normalmente usado para la amplificación utilizando primers 121 y 122. Por otra parte, el satélite repetido de ADN nuclear de 195 pb de *T. cruzi*, es el blanco para los primers Tcz1/Tcz2 y Diaz1/Diaz2, los cuales no amplifican ADN de otros parásitos del género *Trypanosoma o Leishmania.*

Desde hace algunos años, la técnica de PCR ha sido introducida no solamente para reconocer la presencia de *T. cruzi* en diversos hospederos vertebrados, sino también caracterizar las cepas circulantes (Breniere *et al*., 1989; Breniere *et al*., 1995; Breniere *et al*., 1999), abriendo nueva perspectivas de investigación (Noireau, 1999).

Numerosos estudios realizados en la última década han evidenciado que la técnica de PCR en muestras de sangre de individuos infectados posee mayor sensibilidad en relación a otras técnicas de diagnóstico parasitológicas, tales como XD y hemocultivo (Solari *et al.,* 2001a). En Chile, en un estudio realizado en 67 niños menores de 10 años con infección chagásica determinada por serología convencional, PCR evidenció una sensibilidad del 97% (Solari *et al.,* 2001b), mientras que en 79 individuos donantes de sangre serológicamente positivos para *T. cruzi* procedentes de la Región Metropolitana, la sensibilidad para PCR fue del 69,3% (Arancibia, 1998; Soto, 1998). Otros estudios realizados en pacientes crónicos en distintas áreas geográficas del Brasil y en los que se emplearon diferentes volúmenes de muestra, revelaron porcentajes de sensibilidad que oscilan entre el 59.4% y el 100% (Junqueira *et al.,* 1996). Es decir, existirían variaciones de los niveles de parasitemia detectados por PCR que dependerían de la fase de la infección,

edad del paciente, volúmenes de muestras empleados y área geográfica de los individuos analizados.

PCR ha sido además aplicada en la detección de kDNA de *T. cruzi* en deyecciones de triatominos. Bosseno *et al.* (1996), aplicaron PCR en triatominos naturalmente infectados y en sangre de pacientes procedentes de las mismas zonas endémicas entregando importante información epidemiológica. Por otra parte Breniere *et al*. (1995), mediante PCR y ensayos de hibridación en deyecciones de diversas especies de triatominos silvestres, determinaron la existencia de infecciones mixtas e identificaron los principales clones circulantes. Silber *et al.* (1997), aplican PCR en las deyecciones de triatominos alimentados con sangre de pacientes chagásicos. Dorn *et al,* (1999), aplicaron la misma técnica en deyecciones de vectores en Guatemala. Se ha descrito además, la aplicación de PCR en deyecciones y hemolinfa de triatominos recogidos sobre papel filtro, demostrándose alta sensibilidad (Machado *et al.*, 2000). Por otra parte, Dorn *et al.* (2001), reportan la aplicación de PCR en muestras de tejido fresco de triatominos (recto más intestino), en comparación con PCR aplicado en deyecciones de los mismos triatominos, obteniendo porcentajes comparables de sensibilidad. Recientemente, Chiurillo *et al.* (2003), aplicaron PCR a las heces de vinchucas experimentalmente y naturalmente infectadas.

La alta especificidad y sensibilidad demostrada por PCR, ha permitido plantear nuevas hipótesis, que permitirán en el futuro, ampliar el conocimiento acerca de la compleja relación hospedero-parásito en la enfermedad de Chagas crónica.

HIPÓTESIS

La técnica de PCR en deyecciones de triatominos, tiene mayor sensibilidad y detecta más tempranamente que el xenodiagnóstico, la presencia de *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la eficiencia de las técnicas de XD y PCR para la detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de deyecciones de triatominos alimentados con sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar mediante PCR, la presencia de kADN de *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatominos obtenidos por 30, 60 y 90 días

Determinar la sensibilidad de XD y PCR en deyecciones de triatominos incubados por 30, 60 y 90 días.

Establecer si existe complementariedad entre XD y PCR para detectar *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatominos.

MATERIALES Y METODOS

1. Muestra en estudio

50 individuos chagásicos crónicos, 22 hombres y 28 mujeres, (promedio de edad 47,7 años) serológicamente positivos para enfermedad de Chagas (ELISA e IFI), procedentes de la IV Región, V Región y Región Metropolitana Todos concurren anualmente a control por esta afección al Laboratorio de Parasitología Básico Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Fueron clasificados según resultados del XD, en dos grupos:

Grupo I: 25 chagásicos crónicos con xenodiagnóstico positivo
Grupo II: 25 chagásicos crónicos con xenodiagnóstico negativo

B. Método de obtención de triatominos

Los triatominos provienen de una colonia mantenida a 27ºC y un 85% de humedad, libres de infección y alimentados con sangre periférica de aves. Cada caja de XD es preparada con 7 ninfas de tercer estadio de *Triatoma infestans*, nacidas de hembras y machos adultos. Dicha colonia ha sido mantenida por generaciones sucesivas en el actual Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico desde el año 1956.

C. Xenodiagnóstico

Se aplicaron según técnica descrita por Schenone (1999) dos cajitas que contenían cada una 7 ninfas de tercer o cuarto estadío de *T. infestans* libres de infección. Luego de su aplicación por 20 a 30 min en la cara externa de cada brazo de los pacientes en estudio, las cajas fueron mantenidas a 27ºC realizándose un examen microscópico de la muestra fecal de cada insecto a los 30, 60 y 90 días de incubación en búsqueda de las formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

D. Deyecciones de triatominos

Fueron obtenidas a partir de un pool de deyecciones de triatominos alimentados con sangre periférica de los pacientes en estudio mediante la aplicación de XD, a los 30,60 y 90 días de incubación. Las muestras fueron recibidas en tubos eppendorf con Medio Diamond, incubadas a 98º C por 15 min y centrifugadas a 3500 rpm por 3 min. Finalmente, el sobrenadante obtenido fue congelado hasta su uso.

E.- PCR

Se desarrolló de acuerdo a técnicas descritas por Solari *et al* (2001). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µl de la muestra del pool de deyecciones de los triatominos incluidos en ambas cajitas de 30, 60 o 90 días según correspondiera, 2 µl de los oligonucleótidos 121 (5'-AAATAATGTACGGG (T/G) GAGATGCATGA3') y 122 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'), a una concentración de 25 µM, 10 µl de buffer de Taq polimerasa (Tris-HCl pH 8.8 67 mM, 16.6 mM de $(NH_4)_2SO_4$, 6.7 mM de $MgCl_2$, 10 mM 2-Mercaptoetanol), 0.5 µl de BSA, 1µl (0.4 mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 29 µl de agua bidestilada para un volumen final de 50 µl, además de 4 U Taq polimerasa (0.5 µl). Esta mezcla fue cubierta por 80 µl de aceite mineral. La reacción de PCR se compone de un ciclo inicial de 98°C por 2 min seguido por otro de 1 min a la misma temperatura, luego 64°C por 1 min y finalmente 2 min a 72ºC; 33 ciclos intermediarios de 94°C por 1 min, 64°C por 1 min y 72ºC por 2 min y un ciclo final de 72°C por 10 min. La prueba se realizó en un termociclador PTC-100. Luego, 10 µl del amplificado se mezclaron con 4 µl de buffer de carga que contenía xylenxianol y azul de

bromofenol y se sometió a electroforesis durante 90 min a 115 volts en gel de agarosa al 2% (4 gramos de agarosa en polvo en 200 ml de buffer Tris Borato EDTA 1x). El gel fue teñido con bromuro de etidio (10μg/ml) por 10 min y luego fotografiado.

F.- Análisis de resultados

Los resultados del XD, fueron informados por personal técnico adiestrado del Laboratorio de Parasitología, que realiza este procedimiento diagnóstico desde hace más de cuatro décadas. Se consideraron positivas todas aquellas reacciones de PCR en que se detectó la banda de 330 pb, específica para kADN de *T. cruzi*. Todas las reacciones de PCR, se realizaron en duplicado o triplicado con el fin de confirmar los resultados.

G- Recolección de información

Para el presente estudio, se contó con todos los antecedentes relacionados con los pacientes en estudio, incluídas las muestras biológicas necesarias para cumplir los objetivos de esta investigación.

H.- Análisis estadístico de resultados

Se aplicó Prueba de Proporciones para evaluar la hipótesis que PCR es más sensible que el XD para detectar *T. cruzi* y Prueba de Diferencia de Promedios (test de Wilcoxson para muestras dependientes), con el fin de evaluar la hipótesis que PCR es más precoz que el XD para detectar *T. cruzi* en deyecciones. Se estableció como aceptable, un nivel de significación máximo de 0,05. Para el análisis se datos se utilizó el paquete estadístico SPSS (System Package Statistical Science).

RESULTADOS

La muestra en estudio la conformaron 50 individuos chagásicos crónicos, 25 de ellos con XD positivo (Grupo I) y 25 con XD negativo (Grupo II).

Según se describió previamente, a las deyecciones de triatominos incubadas durante 30, 60 y/o 90 días, se les realizó observación microscópica en búsqueda de las formas tripomastigotas móviles de *T. cruzi*. Al mismo tiempo, las deyecciones obtenidas de las ninfas de *T. infestans* contenidas en cada una de las cajitas de XD, fueron pooleadas a partir de las muestras obtenidas en los diferentes períodos de incubación, con el fin de aplicar PCR.

A. Positividad global

En la Tabla I, se observa que el 100% de los casos del Grupo I (XD positivo) tuvo PCR positivo. A su vez, en el 36% de los chagásicos crónicos del Grupo II (XD negativo), se detectó la banda de 330 pb de *T. cruzi*.

En los 25 casos evaluados del Grupo I, el XD fue positivo por primera vez a los 30 días en 11 casos (44%), mientras que a los 60 días fueron positivos 21 casos (84%). Finalmente, en 19 casos (76%), el XD fue positivo a los 90 días, es decir, hubo 4 casos (16%) que sólo se positivizaron a los 90 dias (Tabla 1). En cuanto a PCR, fue positivo por primera vez a los 30 días en 23 casos (92%) y en 25 casos a los 60 días (100%). No obstante, a los 90 días la positividad del PCR fue del 92% (23 casos). El análisis estadístico revela que PCR detecta significativamente en forma más precoz, los parásitos que el XD (p=0,0001).

Tabla 1

Positividad de PCR en deyecciones de triatominos alimentados
en 25 chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I)
según períodos de incubación

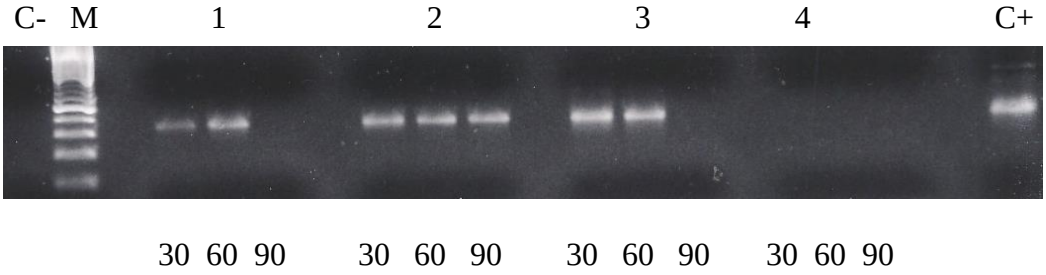
	XD (+) **N**	**PCR (+)** **n**
(*) 30 días	11 (44%)	23 (92%)
(**) 60 días	21 (84%)	25 (100%)
(**) 90 días	19 (76%)	23 (92%)

(*) p=0,005
(**) p>0,05

Figura 3

Amplificación de kADN de *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatominos utilizados en el XD aplicado a pacientes chagásicos crónicos mediante PCR. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con banda de 330 pb que corresponde al amplificado de kDNA del *Trypanosoma cruzi*. Los carriles representan las muestras de 4 pacientes en los períodos de incubación de los triatominos utilizados en el XD (30, 60 y 90 días). C- : control negativo PCR M : marcador 100 pb C+ : control positivo kDNA *Trypanosoma cruzi*

Casos Grupo II (XD negativo)



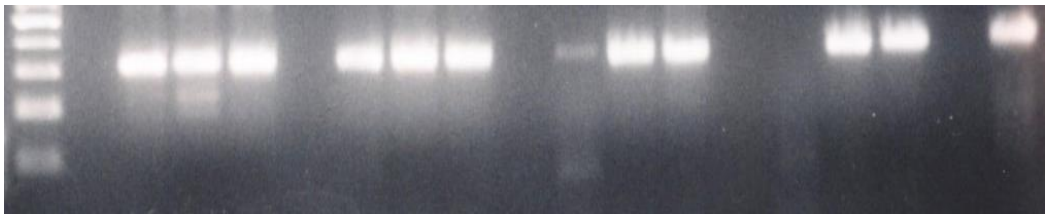
Días de incubación de ninfas de *Triatoma infestans* utilizadas en el XD

Figura 4

Amplificación de kDNA de *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatominos utilizados en el XD aplicado a pacientes chagásicos crónicos mediante PCR. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con banda de 330 pb que corresponde al amplificado de kDNA del *T. cruzi*. Los carriles representan las muestras de 4 pacientes en los períodos de incubación de los triatominos utilizados en el XD (30, 60 y 90 días). M : marcador 100 pb C- : control negativo PCR C+ : control positivo kDNA *T. cruzi*

Casos Grupo I (XD positivo)

M C- 1 2 3 4 C+



30 60 90 30 60 90 30 60 90 30 60 90

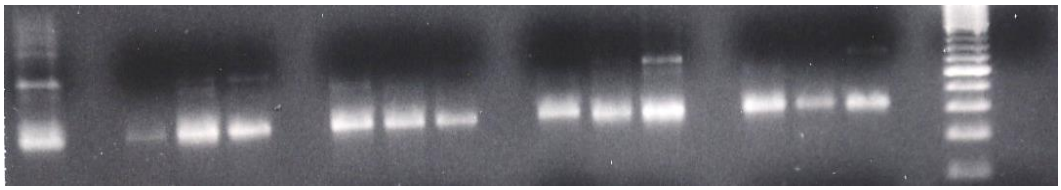
Días de incubación de ninfas de *Triatoma infestans* utilizadas en el XD

Figura 5

Amplificación de kDNA de *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatominos utilizados en el XD aplicado a pacientes chagásicos crónicos mediante PCR. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con banda de 330 pb que corresponde al amplificado de kDNA del *T. cruzi*. Los carriles representan las muestras de 4 pacientes en los períodos de incubación de los triatominos utilizados en el XD (30, 60 y 90 días) C+: control positivo kDNA *T. cruzi* PCR M : marcador 100 pb C- : control negativo

Casos Grupo I (XD positivo)

C+ 1 2 3 4 M C-



30 60 90 30 60 90 30 60 90 30 60 90

B. Rendimiento de cajas aplicadas en el XD

Al evaluar la detección de *T. cruzi*, según las cajitas de XD empleadas, en la Tabla 2 se observa que sólo 7 (28%) de los 11 casos con XD positivo a los 30 días, tuvo una cajita positiva. A los 60 días, 21 casos tuvieron XD positivo, de las cuales fueron positivas con una cajita 12 casos del total (48%). Finalmente, de los 19 casos en que se detectó *T. cruzi* mediante XD a los 90 días, el 40% (10 casos del total) tuvo una cajita positiva.

Tabla 2

Rendimiento de las cajitas de XD aplicadas
a 25 chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I)

	XD (+)	**1 caja (+)**	**2 cajas (+)**
30 días	11	7 (28%)	4 (16%)
60 días	21	12 (48%)	9 (36%)
90 días	19	10 (40%)	9 (36%)

C. Concordancia entre resultados de XD y PCR

En la Tabla 3, se observa que fueron positivos en forma simultánea XD y PCR 11 casos (44%) a los 30 días, 21 casos (84%) a los 60 días y 19 casos (76%) a los 90 días.

En el Grupo II, PCR y XD mantuvieron la condición negativa en 20 casos a los 30 días (80%), en 19 casos a los 60 días (76%) y en 16 casos a los 90 días (64%).

En resumen, en el Grupo I, se obtuvo las mayores concordancias de resultados positivos para ambas técnicas, puesto que 21 de los 25 casos (84%) tuvieron XD y PCR positivo a los 60 días de incubación de los triatominos. Por el contrario, en el Grupo II, la

mayor concordancia en los resultados negativos para ambas técnicas, se observó a los 30 días, en que 20 de los 25 chagásicos fueron XD y PCR negativo (80%).

Tabla 3

XD y PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 50 individuos chagásicos crónicos, según período de incubación. Concordancia de resultados

	30 días (*) **N**	**60 días (**)** **n**	**90 días (***)** **n**
Grupo I (XD+ y PCR+)	11 (44%)	21 (84%)	19 (76%)
Grupo II (XD- y PCR-)	20 (80%)	19 (76%)	16 (64%)

(*) p=0,0044
(**) p>0,05
(***) p>0,05

D. Complementariedad entre resultados de XD y PCR

El Grupo I, está constituido por individuos chagásicos crónicos que positivizaron su XD en uno de los tres períodos de observación microscópica de las deyecciones.

En la Tabla 4, se observa que a los 30 días, 12 casos (48%), tuvieron XD negativo y PCR positivo. A los 60 días, no fue posible detectar al parásito microscópicamente en 4 casos (16%), no obstante, el PCR resultó positivo. Finalmente, a los 90 días, 4 casos (16%), tuvieron XD negativo, mientras que PCR fue positivo. En este grupo de pacientes, no se observaron a los 30, 60 o 90 días resultados de XD positivo y PCR negativo.

En el Grupo II, de individuos chagásicos que no positivizaron su XD al término de los 90 días, PCR fue positivo en 5, 6 y 9 casos a los 30, 60 y 90 días, respectivamente.

Por tanto, la mayor complementariedad entre ambas técnicas para el Grupo I (XD positivo), se obtuvo a los 30 días y en el Grupo II (XD negativo), a los 90 días, en que 9 casos positivizaron su reacción de PCR.

Tabla 4

XD y PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 50 individuos chagásicos crónicos, según período de incubación. Complementariedad de resultados

	30 días (*) **N**	**60 días (**)** **n**	**90 días (***)** **n**
Grupo I **(XD+ y PCR+)**[Δ]	12 (48%)	4 (16%)	4 (16%)
Grupo II **(XD- y PCR-)**	5 (20%)	6 (24%)	9 (36%)

[Δ] XD positivo a los 60 y/o 90 días
(*) p=0,0183
(**) p>0,05
(***) (3)p>0,05

E. Precocidad de resultados de PCR en la detección de *T. cruzi*

En el Grupo I, 14 casos tuvieron XD negativo a los 30 días, es decir, no fue posible observar formas tripomastigotas móviles de *T. cruzi* microscópicamente. No obstante, PCR fue positivo en 12 de estos casos (86%).

A los 60 días, se observa que aún persisten 4 (16%) de los 25 casos del Grupo I que no positivizaron su XD, sin embargo, en este período de incubación, PCR fue positivo. Más aún, en tres de ellos, el PCR ya era precozmente positivo a los 30 días, resultando así el 100% de los casos evaluados, positivos para PCR a los 60 días.

Tabla 5

PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 25 individuos chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I). Precocidad de resultados

	30 días **n**	**60 días** **n**
XD (+) **PCR (+)**	14* 12	4** 4

* XD positivo a los 60 y/o 90 días
** XD positivo a los 90 días

F. Continuidad de resultados positivos de XD

En la Tabla 6 se observa la secuencia de los resultados negativos y positivos para XD y PCR.

En el Grupo I, se pudo observar que en 9 de los 25 casos (36%), el XD resultó negativo a los 30 días y positivo a los 60 y 90 días. En el 24% (6 casos), el XD fue positivo a los 30, 60 y 90 días. En 5 casos (20%), el XD fue positivo a los 30 y 60 días, no obstante, no se logró pesquisar microscópicamente a *T. cruzi* a los 90 días. En el 16% (4 casos), el XD se hizo positivo sólo a los 90 días de incubación de los triatominos. Finalmente, 1 caso (4%), presentó XD negativo a los 30 días, se positivizó a los 69 días y volvió a negativizarse a los 90 días.

Con respecto a la continuidad de resultados del PCR en el Grupo I, en la Tabla 6 se observa que en el 80% (20 casos), los resultados de PCR fueron positivos a los 30, 60 y 90 días. En el 12% (3 casos), el resultado de PCR fue positivo a los 30 y 60 días, pero fue negativo repetidamente a los 90 días. En un caso (4%), el PCR fue negativo a los 30 días y se positivizó a los 30 días, resultado que se mantuvo a los 90 días.

Finalmente, en un caso (4%), el PCR fue negativo a los 30 días, positivo a los 60 días y volvió a negativizarse a los 90 días.

Tabla 6

XD y PCR en deyecciones de triatominos alimentados en 25 individuos chagásicos crónicos, según período de incubación. Secuencia de resultados

Días de incubación de triatominos			**XD**	**PCR**	**P**
30	**60**	**90**			
(-)	(+)	(+)	9 (36%)	1 (4%)	0.0158 (*)
(+)	(+)	(+)	6 (24%)	22 (88%)	0,005 (*)
(+)	(+)	(-)	5 (20%)	1 (4%)	0,086
(-)	(-)	(+)	4 (16%)	0 (0%)	0,086
(-)	(+)	(-)	1 (4%)	1 (4%)	0,50

(*) significativo

Por tanto, los mayores porcentajes de continuidad en este grupo de pacientes se obtienen con la técnica de PCR, en que un 88% de los casos es positivo a los 30, 60 y 90 días. Con la técnica de XD se observa una mayor discontinuidad en los resultados.

DISCUSION

Innumerables estudios han utilizado el XD, particularmente en países en que la enfermedad de Chagas constituye un problema de salud pública. Aún cuando han surgido otros métodos para detectar *T. cruzi*, es aún considerado un eficiente método de diagnóstico, especialmente para ser aplicado en la fase crónica de esta afección (Schenone, 1999). Las ninfas de *T. infestans*, han evidenciado buena sensibilidad para detectar *T. cruzi* en sangre periférica de diversos hospederos infectados. La importante capacidad de ingestión de sangre y la alta tolerancia a la manipulación por parte del examinador, constituyen dos elementos que han permitido la utilización de insectos vectores en el XD (Schenone *et al*., 2000).

Por otra parte, el auge de la biología molecular en los últimos años, ha permitido que la técnica de PCR se constituya en una poderosa herramienta de diagnóstico, que aplicada en sangre periférica (Wincker *et al*., 1994; Solari *et al.*, 2001a; Zulantay *et al.*, 2004), suero (Russomando *et al.*, 1992), tejidos (Vago *et al.*, 2000; Aufderheide *et al.*, 2004; Schijman *et al.*, 2004) y deyecciones de triatominos (Silber *et al.*, 1977**;** Russomando *et al*., 1996**;** Breniere *et al.*, 2002) entre otras muestras biológicas, ha logrado importantes avances en el conocimiento del binomio parásito-hospedero.

Al respecto, importantes han sido las contribuciones desde que se iniciara la aplicación de técnicas moleculares como PCR, Southern blot e hibridación con sondas universales y específicas de *T. cruzi*, en muestras de deyecciones de triatominos vectores. Bosseno *et al.*, (1996), evalúan la distribución de dos genotipos clonales en *T. infestans* y evidencian alta frecuencia de infecciones mixtas en 186 muestras fecales de triatominos procedentes de diferentes zonas geográficas de Bolivia positivos a la microscopía y al

ensayo de PCR. Por otra parte, Revollo *et al.,* (1998), describen la considerable variabilidad biológica de *T. cruzi* al utilizar este tipo de muestra. Breniere *et al.,* (1989), plantean la hipótesis que las diferencias biológicas observadas entre diferentes clones de *T. cruzi* son proporcionales a las distancias evolutivas que los separan. Para ello, utilizaron material obtenido de vectores y mantenido por traspasos sucesivos en medios de cultivo líquido. Bar *et al.,* (2002), determinan la infección de *T. cruzi* en deyecciones de triatominos involucrados en ciclos domésticos y silvestres de distintas zonas endémicas de Argentina, evidenciando un 60% de infección en *T. infestans* domiciliarios y un 12.7% en vectores silvestres, destacando la importancia de este tipo de estudios para los programas de control del vector. Finalmente, Solari *et al.,* (1992) describe la caracterización de poblaciones de *T. cruzi* procedentes de Chile, Bolivia y Argentina mediante análisis enzimático y enzimas de restricción utilizando contenido intestinal de triatominos que fueron crecidos en medio de cultivo líquido o agar base sangre.

Algunas investigaciones muestran que casi la mitad de las infecciones biclonales no son detectadas por el XD después de completar el ciclo, y que existen importantes diferencias en la detección de tales infecciones de acuerdo a los genotipos clonales considerados. Más aún, la eliminación de un genotipo clonal por otro, es frecuente, pero no constante. El uso de PCR y sondas de kADN hace posible evitar la fase de cultivo, lo cual hace la detección de infecciones mixtas mucho más fácil en estudios epidemiológicos. Mas aún, el hecho de que *T. infestans* no transmita diferentes genotipos clonales con la misma eficiencia, tiene fuertes implicancias para la fiabilidad del xenodiagnóstico (Da Silveira Pinto *et al.,* 2002).

En el presente estudio, 50 individuos chagásicos crónicos procedentes de zonas de alta endemia de nuestro país, fueron clasificados en dos grupos, de acuerdo a la parasitemia

determinada por XD. A todos ellos, se les aplicó XD, según la metodología tradicional, con incubación de 30, 60 y 90 días de los triatominos, en búsqueda de las formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A las deyecciones obtenidas en los diferentes períodos, se aplicó la técnica de PCR con el propósito de detectar la banda de 330 pb de kADN del parásito.

Si bien en literatura existen mínimos antecedentes sobre estudios semejantes, discutiremos algunos aspectos relacionados que son de interés en base a la hipótesis planteada, cual es, que la técnica de PCR es más sensible y más precoz para detectar la presencia *de T. cruzi* en deyecciones de triatominos alimentados en pacientes chagásicos crónicos.

En el presente estudio, el 100% de los casos en que se detectó al parásito microscópicamente según XD, la reacción de PCR fue positiva. Para ambas técnicas, la positividad fue determinada a diferentes períodos de incubación, hecho que discutiremos en los párrafos siguientes. Por otra parte, en el Grupo II, constituído por pacientes con XD negativo (probablemente con muy bajos niveles de parasitemia), el 36% de ellos presentó la banda de 330 pb de kADN de *T. cruzi*.

En humanos, Britto *et al.,* (1995), evalúan la detección de *T. cruzi* mediante XD y PCR en sangre periférica de chagásicos crónicos obteniendo sensibilidades del 90% para PCR y del 43% para XD. Shikanai-Yasuda *et al.,* (1996), al evaluar pacientes con infección chagásica crónica que fueron fuente de alimentación de ninfas de *T. infestans*, demuestran que el ensayo de PCR es significativamente más sensible que el XD para la detección de *T. cruzi* (59% y 13%, respectivamente) en muestras de deyección de triatominos, sugiriendo que el PCR podría ser una herramienta útil para estudios epizootiológicos. Britto *et al.,* (2001), evaluaron mediante PCR y XD pacientes chagásicos

post-tratamiento específico. Aquellos que fueron tratados en fase aguda, tuvieron resultados negativos para PCR y XD del 73% y 86%, respectivamente. En casos crónicos, PCR y XD fueron negativos en un 65% y 83%, respectivamente. Por otra parte, en pacientes tratados con placebo, un 73% de ellos tuvo XD negativo, mientras que un 36% de estos casos tuvo PCR positivo. En esta investigación, 9 casos con XD negativo tuvieron PCR positivo en las muestras de deyecciones utilizadas en la observación microscópica, con un porcentaje de positividad del 36%. Junqueira *et al.,* (1996) evalúan a 101 pacientes chagásicos crónicos no tratados mediante PCR y XD, obteniéndo una positividad del 59.4% y 35.6%, respectivamente. Finalmente, Britto *et al.,* (2001), evalúan a 76 pacientes chagásicos crónicos post-tratamiento, revelando mediante PCR y XD que un 33% y un 26%, respectivamente, mantienen parásitos circulantes.

Se han descrito además, numerosos estudios en deyecciones de triatominos para detectar *T. cruzi*. Dorn *et al.,* (1999), analizan mediante PCR y observación microscópica, heces de 135 triatominos de diferentes especies obtenidas de recto, intestino y estómago. Para muestras rectales de *T. dimidiata*, PCR tuvo una sensibilidad del 39.1% y del 24.6% para la observación microscópica, resultados semejantes a los obtenidos con *R. prolixus*, en que PCR fue significativamente más sensible que la microscopía, con porcentajes del 57.6% y 22.7%, respectivamente. Por otra parte, Britto *et al.,* (1999), aplicaron XD y PCR en muestras de deyecciones de triatominos recolectados en zonas endémicas de Minas Gerais, Paraiba, Pianal y Amazonas, en Brasil. Para XD, los porcentajes de positividad fueron del 24.5, 13%, 34.2% y 24% y para PCR del 96.5%, 44,7%, 59.4% y 10%, respectivamente, postulando que los índices de infección por *T. cruzi* son menores en algunas zonas geográficas. Recientemente, Osherov *et al.,* (2003), realizaron estudios de colonización de triatominos en ambientes domésticos y

peridomésticos en la provincia de Corrientes, Argentina. La infección por *T. cruzi* se determinó por observación microscópica directa de las heces de triatominos y mediante PCR. Los autores señalan que la infección demostrada posibilita el reinicio del ciclo de transmisión dado que *T. infestans* presentó índices de infestación e infección de 23.8% y 19.4%, respectivamente.

En relación a la concordancia entre las técnicas de XD y PCR, se observó que en el Grupo I, constituído por individuos chagásicos XD positivo, PCR fue concordante con este resultado en el 44%, 84% y 76% de los casos a los 30, 60 y 90 días de incubación de los triatominos, respectivamente. Es decir, la mayor concordancia entre resultados positivos a la observación microscópica y al PCR, se obtuvo a los 60 días de incubación de los triatominos.

En relación a la concordancia entre los resultados de la observación microscópica y de PCR aplicados en deyecciones de triatominos, Breniere *et al.*, (1995), evalúan la observación microscópica y técnica de PCR en 345 muestras fecales de triatominos de diversas especies procedentes de Bolivia. Para *T. infestans*, ambas técnicas fueron concordantes en el 85.3%. Después de caracterizar los productos de PCR con sondas específicas, confirmaron la importancia de los dos clones mayoritarios circulantes en Bolivia, reportando altos índices de infección mixta, con resultados que favorecen la ausencia de interacción entre los distintos clones. En otro estudio, Breniere *et al.* (1999), comparan la observación directa y PCR en deyecciones de triatominos y obtienen concordancias que fluctúan entre el 77.5% y 89.3% entre ambas técnicas. La probable explicación a estos porcentajes de discordancia la dán los mismos autores, quienes señalan que una concordancia del 74% para PCR, puede ser debida a la falta de purificación de ADN de las muestras fecales por productos de la sangre ingerida por el insecto.

El Grupo II, constituído por 25 pacientes chagásicos cuyo XD fue negativo, presentó una positividad para PCR del 36%. La mayor concordancia entre resultdos negativos para ambas técnicas fue de 80%, 76% y 64%, a los 30, 60 y 90 días de incubación de los triatominos, respectivamente. Se ha descrito, que en la etapa de la enfermedad de Chagas crónica la parasitemia puede tener niveles bajos o altos en diferentes individuos y tiene un carácter variable y fluctuante (Schenone, 1999). Castro *et al.*, (1999), evaluaron a 202 chagásicos crónicos durante 13 años mediante repetidos XD. Las parasitemias fueron altas, medianas y bajas entre los años 1975 y 1991. Por otra parte Cançado, (1999), señala que resultados negativos de XD pueden reflejar períodos de ausencia o baja parasitemia. XD es una técnica que actúa como un medio de cultivo biológico para amplificar *T. cruzi*, de tal manera que los porcentajes de positividad o negatividad alcanzado por PCR en este estudio, sería reflejo de la capacidad que tuvieron los triatominos para amplificar el parásito que se encuentra en bajos niveles en la sangre periférica de estos pacientes (Schenone, 1999).

En relación al rendimiento de las cajas de XD, Schenone *et al.*, (1974, 1991b) evalúan individuos serológicamente positivos a la infección por *T. cruzi*, reportando una sensibilidad para una caja del 46% y de 54.3% con un par de cajas Al aplicar dos cajas en niños, el porcentaje aumenta al 59.6% (Schenone, 1998). Al respecto, en otro estudio Schenone, (1999), aplican un par de cajas al día durante tres días consecutivos a 9 chagásicos crónicos, haciendo un total de 6 cajas aplicadas (42 ninfas). La positividad global de las cajas de XD variaron entre 6.3% y 84.7%, siendo en 3 de pacientes evaluados menor al 12% y en 6 mayor al 52%. Se continuó evaluando en el tiempo a dichos pacientes aplicando un total de 1282 XD, de los cuales resultaron positivos 582 (45.4%), demostrando con ello que el XD seriado tiene alta eficacia para detectar *T. cruzi*. En este

estudio, se analiza el rendimiento del par de cajitas aplicadas según el resultado de la observación microscópica obtenida en cada una de ellas. Se observó un mayor rendimiento en los diferentes períodos de incubación de los triatominos con una cajita (7 ninfas *T. infestans*) (28%, 48% y 40%, a los 30, 60 y 90 días, respectivamente) cuyas diferencias no fueron estadísticamente significativas al considerar 2 cajas de XD. Es necesario considerar que no todas las ninfas usadas en el XD son capaces de producir material útil para la observación microscópica en la detección de *T. cruzi*, debido a que una proporción de ellos no succiona sangre cuando son aplicadas sobre la piel del paciente (Schenone *et al.*, 2000).

En el presente estudio, dos casos presentaron XD y PCR negativo a los 90 días, habiendo presentado resultados positivos para ambas técnicas a los 30 y/o 60 días de incubación de los triatominos. Es probable que esto se deba a triatominos presentes en alguna de las dos cajas que murieron durante el proceso de incubación, representando este hecho una de las limitaciones del método (Schenone, 1999). Una proporción de ellos muere durante el período de mantención en el laboratorio antes de su examen, proporción que alcanza el 7.7%. La mortalidad puede subir drásticamente al 87% cuando los triatominos son incubados durante 120 días (Schenone *et al.*, 2000).

Se ha demostrado la hipótesis planteada sobre la precocidad de PCR en muestras positivas para XD. Independiente del período de incubación en que se comparen ambas técnicas, PCR tiene mejores porcentajes de positividad y detecta precozmente a *T. cruzi*, como se observa a los 30 días, en que se obtiene un 92% de positividad para PCR y 44% para XD (p=0,005). El ciclo completo de *T. cruzi* en el triatomino dura entre 15-60 días, al término del cual es posible detectar el parásito en las deyecciones del insecto, sobre todo en aquellos que presentan una tasa de metaciclogénesis alta, que corresponde a la tasa de transformación de las formas epimastigotas a formas tripomastigotas metacíclicas. Estos

resultados permiten proyectar la técnica de PCR como una herramienta complementaria del XD, puesto que sumado a la mayor sensibilidad de PCR, es el XD quien cumple la función biológica natural de amplificar *T. cruzi*.

Los aportes de este estudio, son fundamentalmente, la posibilidad de realizar estudios con el binomio XD-PCR deyección, con fines diagnósticos, terapéuticos y epidemiológicos, puesto que es posible, con la aplicación de PCR en las deyecciones de los triatominos alimentados sobre los pacientes, acelerar los resultados de XD. Por otra parte, se ha demostrado la mayor sensibilidad de PCR, al evaluar pacientes con XD negativo. Por dichas razones, este estudio ha demostrado que ambas técnicas son complementarias.

CONCLUSIONES

En todos los chagásicos crónicos con XD positivo, se detectó la banda de 330 pb de kDNA de *Trypanosoma cruzi.*

Un 36% de los chagásicos crónicos con XD negativo, presentaron PCR positivo.

PCR constituye una herramienta más precoz para detectar *T. cruzi*. A los 30 días de incubación de los triatominos, la positividad de XD es de un 44% y de PCR de un 88%.

A los 60 días de incubación de los triatominos, PCR pesquisa el 100% de los casos que entre 60 y 90 días fueron positivos a la observación microscópica.

El mayor rendimiento se obtuvo con una caja de XD en los diferentes períodos de incubación de los triatominos no alcanzando significación estadística.

XD actúa como un medio de cultivo biológico que amplifica *T. cruzi*, lo que facilita su detección por PCR, por lo tanto, ambas técnicas son complementarias.

BIBLIOGRAFIA

- **APT, W.; REYES, H**. 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol. al Día 14:23-40.

- **APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; SÁNCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTÉS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JURI, D.** 1994. Tratamiento de la enfermedad de Chagas humana crónica con Itraconazol y Alopurinol. Informe preliminar. Rev. Med. Chile. 122:420-427.

- **APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PÉREZ, C.; MIRANDA, C.; SÁNCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTÉS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JURI, D.** 1998. Treatment of chronic Chagas disease with Itraconazole and Alopurinol. Am. J. Trop. Med. 59:133-138.

- **APT, W.** 1999. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. Parasitol. al Día. 23: 100-112.

- **APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SÁNCHEZ, G.; VARGAS, S.; RODRÍGUEZ, J.** 2003. Itraconazole or alopurinol in the treatment of chronic American tripanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. Ann. Trop. Med. Parasitol. 97(1):23-29.

- **ARANCIBIA, C.** 1998. Perfil epidemiológico y comparativo de métodos directos de diagnóstico de infección chagásica en donantes de sangre. Tesis para optar al título de Tecnólogo Médico. Facultad de Medicina. Universidad de Chile**. (n° Pag)**

- **ATÍAS, A.; APT, W.** 1991. Enfermedad de Chagas. En: Atías, A.; Neghme, A. Parasitología Clínica. 3° Ed. Edit. Mediterráneo. Pág. 255-268.

- **ATIAS, A.** 2000. Parasitología Médica. Editorial Mediterráneo. Pág. 251-264.

- **AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L.E. Jr.; FORNACIARI, G., ALLISON, M.** 2004. A 9000-years record of Chagas disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Feb 17;101 (7):2034-2039.

- **AVILA, H.A.; SIGMAN, D.S.; COHEN, L.M.; MILLIKAN, R.C.; SIMPSON, L.** 1991. Polymerase Chain Reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. Mol. and Biol. Parasitol. 48:211-222.

- **AYALA, F.J.** 1993. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. Biol. Res. 26(1-2):47-63.

- **BAR, M.E.; PIERI DAMBORSKY, M.; OSCHEROV, E.B.; MILANO, A.; FRANCISCO, M.; AVALOS, G.; WISNIVESKY-COLLI, C.** 2002. Triatomines involved in domestic and wild *Trypanosoma cruzi* transmission in Concepcion, Corrientes, Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97(1):43-6.

- **BOSSENO, M.F.; TELLERIA, J.; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F.; MORIN, A.; BRENIERE, S.F.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: Study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. Exp. Parasitol. 83:275-282.

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

- **BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M.** 2000**.** *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2º Ediçao. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil. 431 pp.

- **BRENIERE, S.F.; CARRASCO, R.; REVOLLO, S.; APARICIO, O.; DESJEUX, P.; TIBAYRENC, M**. 1989. Chagas disease in Bolivia: Clinical and Epidemioligical features: Zymodeme vaariability of *Trypanozoma cruzi* stocks isolated from patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41:521-529.

- **BRENIERE, S.F.; BOSSENO, M.F.; TELLERIA, J.; CARRASCO, R.; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F.** 1995. Field application of Polymerase Chain Reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53(2):179-84.

- **BRENIERE, SF**., **BOSSENO, MF., NOIREAU, F., VARGAS, F., YACSIK, N., ALCAZAR, J., TELLERIA, J.** 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. En Cassab, J.A; Noireau, F.; Guillén, G. Chagas la enfermedad en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del programa de control. La Paz, Bolivia. Ministerio de Salud y Previsión Social. P. 217-226.

- **BRENIERE, S.F.; BOSSENO, M.F.; NOIREAU, F.; YACSIK, N.; LIEGEARD, P.; AZMAR, C.; HONTEBEYRIE, M**. 2002. Integrate study of a bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Mem. Ist. Oswaldo Cruz. 97(3):289-295.

- **BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; WINCKER, P.; MOREL, C.M.** 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast AND present in blood samples and its use in Polymerase Chain Reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chaga's disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 88:171-172.

- **BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; VANNI, C.M.M.; HASLOCHER–MORENO, A.; XAVIER, S.S.;WINCKER, P**. 1995. Polymerase Chain Reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitol. 110:241-247.

- **BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; MARQUES, P.; FERNANDES, O.; MOREL, C.M.** 1999. Polymerase Chain Reaction detection: New insights into the diagnosis of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94 (Suppl 1):305-306.

- **BRITTO, C.; SILVERIA, C.; CARDOSO, M.A.; MARQUES, P.; LUQUETTI, A.; MACEDO, V.; FERNÁNDEZ, O**. 2001. Parasite peristence in treated Chagasic patients revealed by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 96:000-000.

- **BRUMPT, E.** 1914. Le xenodiagnóstic: Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la trypanosomose de Chagas. Bull Soc Par Exot. 7: 706-710.

- **CANALS, M.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E**. 2000. Situation of *Mepraia spinolai*, a will vector for Chagas disease in Chile, in relation to others vectors from the perspective of their feeding profile. Rev. Med. Chile. 128(10):1108-12.

- **CANÇADO, J. R.** 1999, Criteria of Chagas Disease Cure. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94, Suppl. 1:331-335

- **CARRASCO, H.J.; FRAME, I.A.; VALENTE, S.A.; MILES, M.A.** 1996. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54(4):418-424.

- **CASTRO, C.; MACEDO, V.; PRATA, A.** 1999. The behavior of *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic chagasics over 13 years. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 32(2):157-65.

- **CHIURILLO, M.A.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; PERALTA, A.; DIAS, M.; GUEVARA, P.; ANEZ, N.; RAMÍREZ, J.L.** 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10(5):775-779.

- **CONTRERAS M.C.; SCHENONE H.; BORGOÑO, J.M.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; SOLIS, F.** 1992. Chagasic infection in blood donors from hospitals in endemic regions of Chile (1982-1987). Epidemiological impact of the problem. Bol. Chil. Parasitol. 47(1-2):10-15.

- **DA SILVEIRA PINTO, A.; DE LANA, M.; BRITTO, C.; BASTRENTA, B.; TIBAYRENC, M.** 2002. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using Kinetoplast DNA probes. Parasitol Res. 88(12):1026-1033.

- **DORN, P.; ENGELKE, D.; RODAS, A.; ROSALES, R.; MELGAR, S.; BRAHNEY, B.; FLORES, J.; MONROY, C.** 1999. Utility of the polymerase Chain reaction of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas disease vectors. Am. J. Trop. Med. Hyg. 60:740-745.

- **DORN, P.L.; FLORES, J.; BRAHNEY, B.; GUTIERREZ, A.; ROSALES, R.; RODAS, A.; MONROY, C.** 2001. Comparison of Polymerase Chain Reaction on fresh tissue samples and fecal drops on filter paper for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. Mem. Ins. Oswaldo Cruz. Río de Janeiro. 96(4):503-505.

- **DVORAK, J.A.** 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. J. Cell. Biochem. 24(4):357-371.

- **FONSECA MURTA, S.; ROMANHA, A.J.** 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 94, Suppl. 1:177-180.

- **FRIAS, D.; HENRY, A.; GONZALEZ, C.** 1998. *Mepraia gajardoi* a new species of Triatominae (Hemíptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. Rev. Chil. Hist. Nat. 71:177-188.

- **GOBLE, F.C**. 1970. South American Trypanosomiase. In: Immunity to Parasitic Animals. Vol 2 Ed G.J. Jackson,R.; Herman y J.Singer. Appleton Century Crofts.

- **GONZALEZ, J.; MUÑOZ, S.; ORTIZ, S.; ANACONA, D.; SALGADO, S.; GALLEGUILLOS, M.; NEIRA, I.; SAGUA, H.; SOLARI, A.** 1995. Biochemical, immunological, and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean north of Chile.

- **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.

- **KITCHIN, P.; KLEIN, V.; ENGLAND, P.** 1985. Intermediates in the replication of kinetoplast DNA minicircles. J. Biol. Chem. 260:3844-3851.

- **LORCA, M.; GARCÍA, A.; BAHAMONDE, M.I.; FRITZ, A., TASSARA, R.** 2001. Certificación serológica de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. Rev. Med. Chile. 129:264-269.

- **MACHADO, E.M.M.; ALVARENGA, N.J.; ROMANHA, A.J.; GRISARD, E.C.** 2000. A simplified method for simple collection and DNA isolation for Polymerase Chain Reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in Triatomine vectors. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 95(6):863-866.

- **MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G.** 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *T.cruzi* circulating indepently in a rural area of Brazil. Trans. R.Soc. Med. Hyg. 71:217-225.

- **MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.** 1978. Isozyme heterogeneity of *T.cruzi* in the first autochthonous patiens with Chagas disease in Amazonian Brazil. Nature. 272:819-821

- **MONCAYO, A.** 1993. Chagas disease. In: TDR Eleventh Programme Report. Geneva: World Health Organization. 67-65.

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

- **MOSER, D.R.; COOK, G.A.; OCHS, D.E.; BAILEY, C.P.; MCKANE, M.R.; DONELSON, J.E.** 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. Parasitology. 99 Pt. 1:57-66.

- **MUÑOZ, S.; LORCA, M.; MUÑOZ, P.; SOLARI, A.** 1994. Highly homogeneous *Trypanosoma cruzi* populations in a low endemic region for Chagas disease: importance in the pathogenesis of Chagas disease in Chile. Rev. Med. Chil. 122 (11):1231-1238.

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

- **OPS**, 1992. Iniciativa de los países del Cono Sur. Primera Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación del *Triatoma infestans* y la Interrupción de la Trasmisión de la Tripanosomiasis Americana por Transfusión Buenos Aires, Argentina. Doc OPS/PNSP/92.18.

- **OPS**, 1999. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Normas técnicas de vigilancia de enfermedades transmisibles. Publicado por el Ministerio de Salud, división de salud de las personas; departamento de epidemiología capítulo 8. 45-47.

- **OSCHEROV, E.B.; BAR, M.E.; DAMBORSKY, M.P.; MILANO, A.M.; AVALOS, G.; BORDA, M.A.** 2003. Chagas' disease epidemiology in the province of General Paz, Argentina. Rev. Saude Publica. 37(1):59-64.

- **OSTE, C.** 1988. Polymerase Chain Reaction. BioTechniques 6:162-167.

- **PAHO** (Pan American Health Organization). 1994. Chagas disease and the nervous system. Scientific Publication N° 547.

- **PINTO DÍAS, J.C.** 1990. Enfermedad de Chagas. Epidemiología-Clínica-Terapéutica. Programa de Salud Humana. Buenos Aires, Argentina.

- **RAY, D.S.** 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. Mol. Cell. Biol. 9:1365-1367.

- **REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.P.; BARNABE, C.; QUESNEYK V.; CARRIERE, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M.**1998. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biogical and medical properties. Exp. Parasitol. 89:30-39.

- **RIOU, G.; PAUTRIZEL, R.** 1969. Nuclear and kinetoplast DNA from trypanosomae. J. Protozool. 16:509-513.

- **RODRÍGUEZ COURA J.; DE CASTRO, S.** 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Mem Ins Oswaldo Cruz. 97(1): 3-24.

- **RUSSOMANDO, G.; FIGUEREDO, A.; ALMIRON, M.; SAKAMOTO, M.; MORITA, K**. 1992. Polymerase Chain Reaction – based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. J. Clin. Microbiol. 30:2864-2868.

- **RUSSOMANDO, G.; ROJAS DE ARIAS, A.; ALMIRON, M.; FIGUEREDO, A.; FERREIRA, M.E.; MORITA.** 1996. *Trypanosoma cruzi*: Polymerase Chain Reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. Exp. Parasitol. Jun; 83(1):62-6.

- **SCHENONE, H.; ALFARO, E.; ROJAS, A.** 1974. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección humana. Bol. Chile. Parasitol. 29:24-26.

- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M. DEL C.; BORGOÑO, J.M.; MATURANA, R.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; TELLO, P.; VILLARROEL, F.** 1991a. Panorama general de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Bol. Chil. Parasitol. 46:19-30 y 509-513.

- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.C.; ROJAS, A.** 1991b. Rendimiento del xenodiagnóstico, según el número de cajas utilizadas en 1.181 personas con infección chagásica crónica diagnosticada mediante la reacción de hemoaglutinación indirecta. Bol. Chil. Parasitol. 46:58-61.

- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M. DEL C.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F.** 1995a. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Frecuencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* por grupo de edad y por regiones. Bol. Chil. Parasitol. 50:84-86.

- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M DEL C.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F.** 1995b. Positividad del xenodiagnóstico según edad, en personas con serología positiva para enfermedad de Chagas. Bol. Chil. Parasitol. 50:40-43.

- **SCHENONE, H.** 1998. Tratamiento Etiológico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas en niños de Chile. Rev. Pat. Trop. 27 (supl.):33-34.

- **SCHENONE, H.** 1999. Xenodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94. Suppl. I. 289-294.

- **SCHENONE, H.; ROJAS, A.; MERCADO, R.; CASTILLO, D.** 2000. Comparative study of sensitivity and mortality of *Triatoma infestans* nymphs III and IV used in the xenodiagnosis of chronic chagasic patients. Bol. Chil. Parasitol. 55(1-2):14-17.

- **SCHENONE, H.; CONTRERAS, M. DEL C.; SOLARI, A.; GARCIA, A.; ROJAS, A.; LORCA, M.** 2003. Nifurtimox treatment of chronic Chagasic infection in children. Rev. Med. Chil. 131(9):1089-1090**.**

- **SCHIJMAN, A.G.; VIGLIANO, C.A.; VIOTTI, R.J.; BURGOS, J.; BRANDARIZ,S.; LOCOCO, B.E.; LEZE, M.I.; ARMENTI, H.A.; LEVIN, M.J.** 2004. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 70(2): 210-220.

- **SHELINE, C.; RAY, D.S.** 1989. Specific discontinuites in *Leishmania tarentolae* minicircles map within universally conserved sequence blocks. Mol. Biochem. Parasitol. 37:151-158.

- **SHIKANAI-YASUDA, M.A.; OCHS, D.E.; TOLEZANO, J.E.; KIRCHHOFF, L.V.** 1996. Use of the Polymerase Chain Reaction for detecting *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90(6):649-651.

- **SILBER, A.M.; BUA, J.; PORCEL, B.M.; SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M.** 1997. *Trypanosoma cruzi:* specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. Exp. Parasitol. 85(3):225-232.

- **SIMPSON, L.** 1987. The mitocondrial genome of kinetoplast protozoa: Genomic organization, transcription; Replication and Evolution. Ann. Rev. Microbiol. 41:363-382.

- **SOLARI, A.; MUÑOZ, S.; VENEGAS, J.; WALLACE, A.; AGUILERA, X.; APT, W.; BRENIERE, S.F.; TIBAYRENC, M.** 1992. Characterization of chilean, bolivian, and argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme análisis. Exp. Parasitol. 75(2):187-195.

- **SOLARI, A.; CONTRERAS, M. DEL C.; LORCA, M.; GARCÍA, A.; SALINAS, P.** 1998. Rendimiento del xenodiagnóstico y el PCR para evaluar el tratamiento quimioterapéutico específico de la enfermedad de Chagas en niños. Bol. Chileno Parasitol. 53 (1-2):27-30.

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

- **SOLARI, A.; ORTÍZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; CAMPILLAY, R.; CONTRERAS, P.; SALINAS, A.; ROJAS, A.; SCHENONE, H.** 2001b. Treatment of *Trypanosoma cruzi* – infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. J. Antimicrob. Chemother. 48 (4):515-519.

- **SOTO, A.** 1998. Diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 59p.

- **STURM, N.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L.** 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cell by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences; use in diagnosis of Chagas Disease. Mol. Biochem. Parasitol. 33:205-214.

- **TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J.** 1986. Natural populations of *T.cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:115-119

- **TIBAYRENC, M.; AYALA, F.** 1988. Isoenzyme variability in *T.cruzi*, the agent of Chagas diseas: genetical, taxonomical and epidemiological significance. Evolution. 42:277-292.

- **TIBAYRENC, M.; BRENIERE, S.F.** 1988. *Trypanosoma cruzi*: major clones ratherthan principal zymodemes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 83 Suppl. 1: 249-255.

- **VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES, S. JR.; MOREIRA, M.C.; FILHO, G.B.; PENA, S.D.** 2000. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am. J. Pathol. 156(5):1805-1809.

- **VENEGAS, J.; ORTIZ, S.; MUÑOZ, S.; SOLARI, A.** 1997. Molecular karyotype and schizodeme analysis of *T.cruzi* stock from chilean triatomines. Parasitology. 115:41-46.

- **WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, A.; RASSI, A.** 1992. Chagas' Disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISTB Brazil 92, Sao Paulo.

- **WINCKER, P.; BRITTO, C.;PEREIRA, J.B.; CARDOSO, M.A.; OSLEMANN, W.; MOREL, C.M.** 1994. Use of a simplified Polymerase Chain Reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in a rural endemic area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 51:771-777.

- **WIRTH, D.F.; ROGERS, W.O.; BARKER; DOURADO, H.; SUESEBANG, L.; ALBUQUERQUE, B.** 1989. Leishmaniasis and malaria: DNA probes for diagnosis analysis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 569:183-192.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. 1991. Control of Chagas'Disease. World Health Organization. Expert Committee. P. 97.

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

- **ZULANTAY, I.; APT, W.; RODRÍGUEZ, J.; VENEGAS, J.; SÁNCHEZ, G.** 1998. Evaluación serológica del tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica con Alopurinol e Itraconazol. Rev. Med. Chile. 126:265-270.

- **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. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 48(4): 253-257.