

Raúl H. Lucero¹
Bettina L. Brusés¹
Daniel E. Merino²
Gustavo J. Fernández³
Ernesto C. Crenna³
José M. Alonso⁴

Correspondencia:
Raúl Horacio Lucero
Instituto de Medicina Regional (UNNE)
Av. Las Heras 727
(3500) Resistencia, Argentina
E-mail: rhlucero@bib.unne.edu.ar

¹Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Medicina Regional (Universidad Nacional del Nordeste-UNNE)

²Área de Medicina Tropical. Instituto de Medicina Regional (Universidad Nacional del Nordeste -UNNE)

³Servicio de Parasitología Regional. Hospital Pediátrico "Juan Pablo II" Prov. de Corrientes

⁴Área de Inmunología- Instituto de Medicina Regional (Universidad Nacional del Nordeste -UNNE)

Enfermedad de Chagas congénito en Hospitales de la ciudad de Corrientes-Argentina

ORIGINAL

Resumen

Entre Enero de 2005 y Junio de 2006 se estudiaron 2075 embarazadas de los Hospitales "A. I. de Llano" y "J. R. Vidal" de la Ciudad de Corrientes. Se les efectuó Hemoaglutinación Indirecta (HAI) y test de ELISA. En los recién nacidos de aquellas pacientes que resultaron seroreactivas se les practicaron métodos parasitológicos directos (MPD) de Microstrout y Gota Gruesa, y amplificación por PCR y se consideró positiva toda muestra que presentara la banda específica de 330pb del ADN kinetoplastídico.

Del total de embarazadas, 130 resultaron seropositivas (6,26%). Se estudiaron 104 recién nacidos, detectándose 8 positivos por los MPD (7,7%) y 12 positivos por PCR (11,5%).

Los casos confirmados fueron tratados con Beznidazol durante 60 días.

La prevalencia de la infección chagásica encontrada en embarazadas de la Provincia. de Corrientes está dentro de la esperada para áreas endémicas de Latinoamérica (entre 2% y 51%), mientras que la prevalencia de infección connatal hallada del 11,5% es significativamente mayor que la registrada en otras áreas endémicas de Argentina.

Nuestros resultados demuestran, como otros reportados anteriormente en la literatura, que un protocolo de PCR optimizado como el usado aquí fue más sensible en la detección de *Trypanosoma cruzi* en pacientes con Chagas congénito.

Palabras clave: PCR. kADN. Infección connatal.

Summary

Between January 2005 and June 2006, 2075 pregnant women from "A.I. de Llano" and "J. R. Vidal" Hospitals from Corrientes were studied. Indirect Hemagglutination (HAI) and ELISA test were performed. In seropositive patients' newborn direct parasitologic methods (DPM) of Microstrout and bulk drop, and PCR amplification were made. Every sample with the specific band of 330pb of the kinetoplastide DNA was considered positive. Confirmed cases were treated during 60 days with Beznidazole.

From total of pregnant women, 130 were seropositive (6,26%). From 104 newborn studied, 8 were positives by the DPM (7,7%) and 12 were positives by PCR (11,5%). From all diagnosed patients, only 7 cases received treatment due to the impossibility to locate them. The prevalence of Chagas infection found in pregnant women of the Province of Corrientes is the usual for endemic areas of Latin America (between 2% and 51%), whereas the prevalence of congenital infection (11.5%) is significantly greater than the recorded one in other endemic areas of Argentina.

Our results as well as others reported in the literature, show that the optimized PCR protocol used here was more sensitive in detecting the presence of *Trypanosoma cruzi* in Congenital Chagas' Disease.

Key words: PCR. kDNA. Congenital infection.

Introducción

Las estimaciones actuales de la Organización Mundial de la Salud, indican que en América Latina entre 16 a 18 millones de personas están infectadas por el *Trypanosoma cruzi* y otras 90 millones en riesgo, lo que representa una prevalencia media del 4% de la población total de Latinoamérica, aunque en ciertas regiones la prevalencia local puede superar al 75%¹.

La infección humana por *T. cruzi* puede presentarse de diferentes formas según las circunstancias y situaciones. La interacción parásito-hospedero es dinámica en el caso de la Enfermedad de Chagas humana y está relacionada con múltiples factores y condicionantes ligados al *Trypanosoma* (cepa, virulencia, inoculación), al hombre (edad, sexo, intercurencias) y al medio ambiente².

Los programas de control del vector implementados en los últimos años en Argentina permitieron que 4 de las 18 provincias ubicadas en el área endémica fueran declaradas libres de transmisión vectorial; sin embargo la provincia de Corrientes continúa siendo un área en la que el *T. infestans* está presente. Aunque la transmisión vectorial del *T. cruzi* ha generado la mayor cantidad de casos de la enfermedad de Chagas, actualmente se estima que entre un 2,0% y un 8,0% de las madres infectadas que dan a luz transmiten el parásito a su hijo recién nacido. Existe consenso acerca de que, aún cuando se interrumpiera totalmente la transmisión vectorial, la infección congénita continuará siendo un problema de salud pública hasta que las mujeres infectadas en edad gestacional disminuyan proporcionalmente y por ello seguirían apareciendo casos de Chagas congénito por más de treinta años³.

De todas las formas clínicas de la enfermedad, la congénita es la que más demanda un diagnóstico rápido y de alta sensibilidad y la serología convencional no tiene mayor utilidad hasta los seis meses de edad del niño. Cuando no se logra detectar la presencia de *T. cruzi* en el niño se corre el riesgo de un tratamiento insuficiente o desacertado, con graves consecuencias futuras, y si se tiene en cuenta que cuanto más precoz es el tratamiento, el niño tiene mayores posibilidades de curarse, estos hechos son aún más preocupantes. Además, se debe tener en cuenta que en esta etapa el tratamiento correcto puede llevar a la curación completa⁴.

El diagnóstico de laboratorio clásico se basa en procedimientos que evidencian la presencia del parásito en sangre periférica o los que permiten detectar anticuerpos específicos. Aunque los primeros constituyen el diagnóstico de certeza, sólo es posible practicarlo con éxito en la etapa aguda de la enfermedad, en la que la concentración de anticuerpos es baja. Por el contrario, en la fase indeterminada o crónica de la enfermedad, se recurre a los métodos serológicos.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido recomendada como una herramienta útil y aplicable al diagnóstico de la infección congénita ya que permite amplificar pequeñas cantidades del ADN presente en una muestra reproduciendo *in vitro* la replicación que ocurre *in vivo* en las células, aún cuando se reconoce que es costosa y no accesible a la mayoría de los centros sanitarios⁵.

En razón de todo lo anterior se resolvió hacer un relevamiento a fin de evaluar la situación actual de la transmisión congénita de esta patología en los dos centros de atención hospitalaria materna más importantes de la ciudad de Corrientes, ubicada en el área endémica del Noreste de Argentina.

Materiales y métodos

Entre Enero de 2005 y Junio de 2006 se estudiaron 2075 embarazadas que concurren para su atención a los Hospitales "A. I. de Llano" y "J. R. Vidal" de la Ciudad de Corrientes, Argentina.

En todas se tomó una muestra de sangre para realizar determinaciones de Hemoaglutinación Indirecta (HAI) y test de Enzimoimmunoensayo (ELISA). Las que resultaron positivas fueron citadas nuevamente con el fin de solicitarles consentimiento informado por escrito para estudiar a su hijo al momento del parto. Para la investigación de la infección congénita se realizaron extracciones de sangre periférica del recién nacido (RN) con y sin anticoagulante para realizar métodos parasitológicos directos (MPD) de Microstrout y Gota Gruesa, y PCR.

Extracción de ADN mediante el método de CTAB (Hexadecyl trimethyl Ammonium bromide)

Se partió de 700 μ l. de sangre entera, anticoagulada con EDTA 1%. Se eliminaron los glóbulos rojos mediante 3 lavados con igual volumen de un buffer de lisis de glóbulos rojos (10 mM Tris-HCl pH 7.6; 5 mM MgCl₂; 10 mM NaCl). Luego se incubó a 60°C durante 1 hora aproximadamente, con una solución de homogeneización (2% (p/v) de CTAB; 1,4 M de NaCl; 0,2% (p/v) β -mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 7.5). Posteriormente, se procedió a la extracción de proteínas con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Con posterioridad a la centrifugación, la solución quedó dividida en 3 fases: una fase superior o acuosa, donde están en solución, los ácidos nucleicos; una fase intermedia o interfase, que contiene las proteínas; y una fase inferior, en la que se concentran los lípidos. La fase superior se transvasó a otro tubo Eppendorf, se precipitó la fase acuosa con alcohol isopropílico. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante, y se agregó 1 ml. de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante, y se dejó evaporar el alcohol. Finalmente se resuspendió el ADN obtenido en agua destilada estéril.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

PCR con primers kinetoplastícos

Se preparó una solución madre de un volumen final de 22,5 μ l por tubo de reacción, conteniendo agua destilada estéril; buffer 10X; Cl₂Mg 50 mM; 100 mM de dNTP's; 25 mM de cada uno de los primers: #121 y #122; Taq Polimerasa 1U y 2,5 μ l de la muestra de ADN.

La secuencia de los primers utilizados es:

121: 5'-AAATAATGTACGGGKAGATGCATGA-3'

122: 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA-3'

La reacción de amplificación, se llevó a cabo en termociclador MyCicler (BIORAD), y se siguieron las siguientes condiciones de ciclado: 5 minutos a 95°C; 1 minuto a 60°C; 1 minuto a 72°C; 33 ciclos de: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C, correspondientes a la desnaturalización, hibridación y extensión de los primers respectivamente; y por último, 1 ciclo de 5 minutos a 72°C como extensión final.

El tamaño del fragmento amplificado es de 330pb.

PCR con primers para secuencia satélite nuclear

La preparación de la master mix se realizó en idénticas condiciones a la anterior y la secuencia de los primers TCZ utilizados fue:

TCZ1: 5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3'

TCZ2: 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'

El programa de ciclado utilizado fue:

95° 2', 95° 10'', 55° 10'', 72° 10'' (5 veces los últimos tres pasos), 95° 10'', 60° 10'', 72° 10'' (30 veces los últimos tres pasos) y 72° 5'.

El tamaño del fragmento amplificado es de 195pb.

Electroforesis

se preparó un gel de agarosa al 3% donde se sembraron 9 µl. del producto amplificado, y 1 µl de buffer de corrida. Se corrió a 70 V. durante 35 minutos aproximadamente, tiempo y voltaje necesarios para poder observar la banda de 330 pares de bases correspondiente al ADN kinetoplastídico y 195 pb para ADN nuclear.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (BrEt) y a continuación se lo colocó en el transiluminador UV para la visualización de las bandas específicas (Figura 1).

Digitalización de imágenes

Las imágenes de los amplicones obtenidas fue registrada mediante un Digitalizador de imágenes UVITEC (modelo UVIPRO bronze) y analizada con el Software provisto por el fabricante (UVISoft).

Resultados

De las 2.075 embarazadas estudiadas se constató que 130 (6,26%) eran positivas para los estudios serológicos y de ellas pudieron estudiarse un total de 104 Recién Nacidos. De éstos, 8 (7,7%) fueron positivos por los métodos parasitológicos directos y 12 (11,5%) positivos por PCR (los 8 anteriores más 4 casos nuevos no detectados por MPD).

Discusión

Ha sido previamente demostrado que existe un aumento de la parasitemia en el último trimestre de gestación⁵ y esto puede reflejarse en una infección congénita que varía entre 1,1% al 18,5%, dependiendo de los métodos diagnósticos empleados⁶.

En 1997, el Subprograma de Control de la Mujer Embarazada estudió 58.196 mujeres de 13 provincias argentinas y halló que un 9% de ellas eran seropositivas.

Un reporte que abarca datos serológicos de embarazadas de la Provincia de Santiago del Estero entre los años 1998 y 2001 revela una prevalencia promedio del 6,31% en un total de 26.113 muestras⁷.

Si bien el presente estudio abarca un número menor de embarazadas la prevalencia es similar sobre todo teniendo en cuenta que tanto la Provincia de Santiago del Estero como la Provincia del Chaco se encuentran dentro de las zonas altamente endémicas para esta patología en Argentina.

Los primeros reportes publicados por investigadores brasileros donde utilizan PCR para el diagnóstico de Chagas en sangre de pacientes datan del año 1991⁸, de ahí en adelante la prevalencia de parasitemia tanto en Chagas agudo, crónico y congénito ha ido en aumento en concordancia con el empleo de esta herramienta más sensible⁹.

Un recién nacido con Chagas congénito, producto de un parto prematuro puede pesar aproximadamente 2,5 kg. y su nivel de parasitemia promedio es de un parásito por 2.500 microlitros de sangre. Debido a que los métodos de Gota fresca, Microstrout, y Hemocultivo poseen límites de detección inferiores ($p=0.01$, $p=0.12$, y $p=0.4$ respectivamente) ellos no podrán

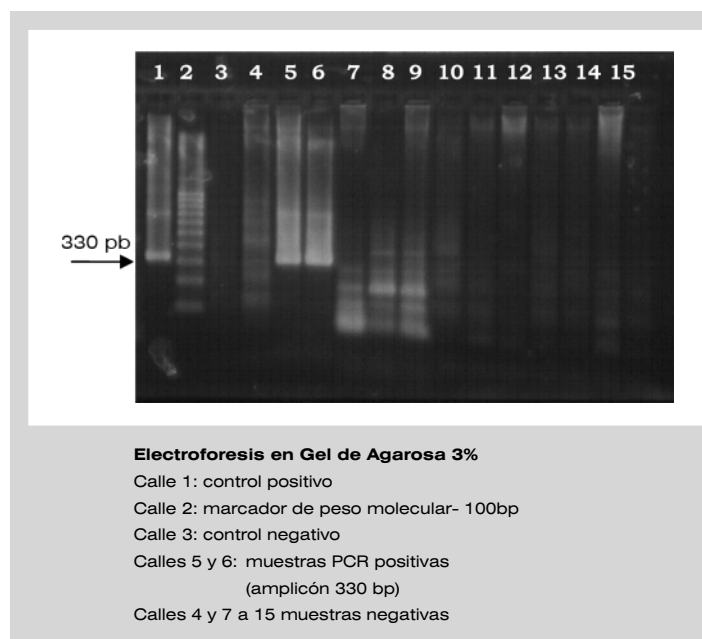


Figura 1.

detectar esta baja parasitemia y por lo tanto los centros diagnósticos que usen sólo estas herramientas no tratarán a los niños en cuestión, quedando expuestos a severas e irreversibles consecuencias futuras⁴.

En este estudio queda claro que hubo un 4% más de detección de casos positivos al añadir la PCR como método diagnóstico, los cuales hubieran sido tomado como negativos por los métodos convencionales. Existió un caso (0,9%) donde el parasitológico directo dio positivo y no amplificó la reacción de PCR. Debido a que cada amplificación se hizo por triplicado, la explicación a esto se debe buscar en inhibidores intrínsecos de la PCR o un falso positivo del método microscópico.

Nuestros resultados son similares a los de publicaciones previas y permiten aconsejar el empleo de la PCR en el diagnóstico de la infección congénita y en el seguimiento del tratamiento¹⁰⁻¹². Si bien la PCR es más sensible que las pruebas parasitológicas directas, su empleo en el Recién Nacido debe ser realizado con ciertas precauciones ya que una prueba positiva sin parasitemia se podría deber al pasaje de fracciones parasitarias o de escasa cantidad de parásitos a través de la placenta que el sistema fagocito-macrófago del niño podría controlar sin desarrollar enfermedad. Por ello todo niño

con tan solo una PCR positiva debería ser controlado nuevamente con esa metodología en un lapso de unos 15-30 días, y considerarlo infectado luego de dos resultados positivos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Fundación Bunge y Born de Argentina, cuyo aporte resultó esencial para la concreción del mismo.

Bibliografía

- Ladzdins J. The southern cone initiative. *TDR News WHO* 2001;65:11.
- Días JCP. Factores biológicos y ecológicos en la enfermedad de Chagas. Tomo II. Parásitos- Reservorios- Control- Situación regional. Aspectos socioculturales y económicos relativos al vector de la enfermedad de Chagas 1985; 23:289- 304.
- Carlier Y, Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(6):767-71.
- Basombrío MA, Nasser J, Segura MA, et al. The transmission of Chagas disease in Salta and the detection of congenital cases. *Medicina* (Buenos Aires) 1999;59 Suppl 2: 143-6.
- Freilij H, Altech J. Congenital Chagas Disease: Diagnostic and Clinical Aspects. *Clin Infect Diseases* 1995; 551-5.
- Nisida IV, Amato Neto V, Braz LM, Duarte MI, Umezawa ES. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in Sao Paulo City, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999;41:305-11.
- Barbieri GP, Loza L, Moran L, et al. Prevalencia de serología positiva para enfermedad de Chagas en embarazadas de Santiago del Estero. Reporte 4 años. Chagas Disease. 2001 (activo Febrero 2007) <http://www.fac.org.ar/tcvc/lave/tl291/tl291.htm> -
- Avila H, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase Chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysate: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991;48:211-22.
- Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brasil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 129- 32.
- Schijman AG, Altech J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003;52:441-9.
- Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59(3):487- 91.
- Britto C, Cardoso MA, Vanni CMM, Hasslocher Moreno A, Xavier S, Oeleman W, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evolution. *Parasitology* 1995;110:241-7.