

Infectio

Asociación Colombiana de Infectología

www.elsevier.es/infectio



ORIGINAL

Diagnóstico de enfermedad de Chagas en maternas y recién nacidos de Moniquirá y Miraflores, Boyacá, Colombia

Fred Manrique-Abril^a, Juan Manuel Ospina^a, Giomar Herrera A^c, Carolina Florez^b y Concepción Puerta Bula^c

^aUniversidad Nacional de Colombia y Grupo Salud Pública, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia

^bGrupo de Investigación en Salud Pública, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia

^cLaboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia

Recibido el 10 de diciembre de 2012; aceptado el 19 de febrero de 2013

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Chagas;
Trypanosoma cruzi;
Intercambio materno-fetal;
Colombia

Resumen

Objetivo: Se estudia la infección por *Trypanosoma cruzi* en mujeres embarazadas en Moniquirá y Miraflores, en Boyacá, Colombia, y la transmisión transplacentaria.

Materiales y métodos: Se programó el tamizaje de 826 maternas (600 a 950) en los 2 municipios, se logró un total de 702 participantes de las cuales se procesaron 659 muestras (358 de Moniquirá y 301 de Miraflores), mediante técnicas de ELISA en papel de filtro y se confirmaron las positivas con ELISA en suero, inmunofluorescencia indirecta, hemocultivo y reacción en cadena de la polimerasa.

Resultados: La prevalencia actual de enfermedad de Chagas en maternas es de 3,34% (22/659), 3,99% (12/301) en Miraflores y 2,79% (10/358) en Moniquirá. De 22 maternas en seguimiento, se logró obtener datos de 18 de los recién nacidos (RN), de los cuales 6 fueron positivos para las pruebas de hemocultivo. Se consideró el hemocultivo como la técnica confirmatoria de parasitemia en RN antes de 8 meses, por lo tanto, la incidencia transplacentaria global sería de 27,27% RN positivos/año (6/22). Luego del seguimiento del entorno hogar y peridomicilio, búsqueda de triatomíneos y fumigación de la vivienda, se inició tratamiento de RN con benznidazole a razón de 5-8 mg/kg/día durante 60 días.

Conclusiones: La prevalencia en maternas obtenida es superior a los reportes en Chile y Brasil; pero inferiores a Bolivia, Argentina y Uruguay.

La incidencia transplacentaria encontrada en un año de seguimiento es similar a la reportada en Chile (16 al 28%), superior a la de Brasil (1%), Uruguay (0,5 a 3%) y Bolivia y Paraguay (7%).

© 2013 ACIN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fgma75@hotmail.com (F. Manrique-Abril).

KEYWORDS:
Chagas disease;
Trypanosoma cruzi;
Maternal-fetal
exchange;
Colombia

Diagnosis of Chagas disease in Pregnant Women and Newborns in Moniquirá and Miraflores, Boyacá, Colombia

Abstract

Objective: To study *Trypanosoma cruzi* infection and transplacental transmission in pregnant women in Moniquira and Miraflores in Boyacá, Colombia.

Material and Methods: Screening of 862 mothers (600 to 950) in both municipalities, reaching a total of 702 participants from whom 659 samples were processed (358 from Moniquira and 301 from Miraflores). This screening used Elisa techniques with filter paper, and the positives were confirmed with ELISA in serum, IIF, blood cultures and PCR.

Results: The current prevalence of Chagas disease in mothers is 3.34% (22/659), 3.99% (12/301) in Miraflores and 2.79% (10/358) in Moniquira. Of the 22 mothers who were followed, data was obtained from 18 of their newborns, 6 of whom had positive blood culture tests. Blood cultures were considered the confirmatory technique for parasitemia in newborns before 8 months; therefore, the overall transplacental incidence was 27.27% positive newborns per year (6/22). After following-up at the homes and peridomiciles, searching for triatominae and fumigating the homes, we began treatment for the newborns with benznidazole at a rate of 5-8 mg/kg/day for 60 days.

Conclusions: The prevalence rate found in mothers was greater than the prevalence rates reported for Chile and Brazil but lower than those for Bolivia, Argentina and Uruguay. The transplacental incidence found after 1 year of follow-up was similar to that reported in Chile (16%-28%) and higher than those of Brazil (1%), Uruguay (0.5%-3%), Bolivia (7%) and Paraguay (7%).

© 2013 ACIN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el flagelado *Trypanosoma cruzi*, la cual afecta principalmente a Centro y Sudamérica, encontrándose 18 millones de personas infectadas en 15 países endémicos, con una incidencia anual de 200.000 casos nuevos¹. Aun cuando la principal vía de transmisión de esta enfermedad es a través de los insectos vectores de la familia Reduviidae, el parásito también puede ser transmitido de madres infectadas al feto *in utero*^{1,2}. La infección intrauterina puede ocurrir tanto en la etapa aguda como crónica de la infección materna y afectar a embarazos sucesivos y gemelares. Los recién nacidos (RN) infectados pueden presentar un amplio espectro de manifestaciones que van desde RN aparentemente sanos y de peso adecuado a la edad gestacional (90%) hasta cuadros graves que pueden conducir a la muerte, especialmente de los RN prematuros, siendo la hepatoesplenomegalia el hallazgo más común¹⁻³. Otras observaciones menos frecuentes son síntomas neurológicos tales como convulsiones, hipotonía y temblor de brazos y piernas. También se puede presentar fiebre, ictericia, anemia y edemas².

Aun cuando la transmisión vertical de *T. cruzi* no puede ser prevenida, el diagnóstico rápido y oportuno de los RN infectados es prioritario por cuanto se sabe que cuanto más temprano se inicie el tratamiento antiparasitario específico, los RN tienen una mayor recuperación, llegando a presentarse tasas de curación hasta del 100% tras el tratamiento⁴, evitando así el desarrollo de cardiopatía chagásica crónica posteriormente en su vida. Los medicamentos de elección, actualmente son el benznidazole

(Rochagan[®]) y nifurtimox (Lampit[®], Bayer), los cuales tienen muy pocos efectos secundarios en RN^{5,6}.

El diagnóstico de la infección materna se basa en la serología convencional, en tanto que el diagnóstico en el RN se realiza por exámenes parasitológicos directos que demuestren la presencia del parásito^{3,7}, de manera que se utilizan tanto exámenes directos como examen en fresco, frotis sanguíneo seguido de tinción de Giemsa y de concentración tales como el método de Strout, microhematocrito, gota gruesa y hemocultivo, entre otros. Estos métodos no presentan ningún inconveniente en el caso de RN con elevadas parasitemias.

No obstante, en el caso de RN asintomáticos con bajos niveles de parásitos circulantes, se hace necesario el uso de otras técnicas que tengan una mayor sensibilidad. Es así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha constituido en una herramienta útil para el diagnóstico de la infección en los RN, la cual está siendo ampliamente utilizada en países como Chile y Argentina^{3,7,8}.

Entre los blancos de amplificación más usados se encuentran blancos nucleares como la secuencia repetida del ADN satelital de 195 pb^{9,10}, el elemento repetitivo E13¹¹, dominio D7 del gen codificante para la subunidad 24Δ del ARN ribosomal^{12,13}, la secuencia repetida de la proteína flagelar F29¹⁴, el gen codificante para la histona H2A¹⁵ y secuencias conservadas de los minicírculos del kinetoplasto¹⁶⁻²⁰. Entre estas pruebas, las PCR que utilizan los cebadores TcZ1/TcZ2 y 121/122, las cuales amplifican el fragmento de 195 pb del ADN satelital y una banda de 330 pb del ADN del kinetoplasto, respectivamente, han sido utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas transplacentaria con una elevada sensibilidad y especificidad, así como también en el

seguimiento del tratamiento de los RN^{8,10}. Asimismo, la PCR basada en los genes codificantes para la histona H2A ha sido recientemente descrita y estandarizada en el Laboratorio de Parasitología Molecular de la Pontificia Universidad Javeriana, encontrándose que dicha prueba tiene una elevada especificidad y sensibilidad cuando se aplica tanto a ADN obtenido de cepas en cultivo como al extraído a partir de vectores infectados natural y experimentalmente¹⁵.

Además, resultados preliminares de un estudio reciente en muestras sanguíneas humanas sugieren una muy buena correlación de esta prueba con otras PCR como la que utilizan los cebadores S35/S36. Recientemente, el desarrollo de la técnica de PCR en tiempo real ha demostrado ser una herramienta valiosa para la cuantificación de la carga parasitaria²¹, de manera que esta aproximación puede ser de gran utilidad en el seguimiento de los RN infectados tratados.

Por otra parte, dada la reciente división de *T. cruzi* en los grupos I y II, el cual a su vez se subdivide en los subgrupos Ila, I Ib, I Ic, I Id y I Ie²², se han iniciado estudios tendientes a asociar la cepa del parásito con la presentación clínica de la enfermedad. Es así como en los países del Cono Sur, en donde se han reportado tanto cardiomegalias como megavisceras, *T. cruzi* II es el genotipo predominante, mientras que en países de la región norte de Sudamérica, en donde la miocardiopatía es la manifestación predominante, el genotipo circulante es en su mayoría *T. cruzi* I²³. A este respecto, llama la atención cómo la mayoría de los RN infectados en Chile son asintomáticos, mientras que en Bolivia, estos presentan síntomas compatibles con la infección³.

Por otra parte, es importante señalar que la enfermedad de Chagas transplacentaria no se limita a las áreas rurales, en donde ocurre transmisión vectorial, sino que cada vez con mayor frecuencia se tienen reportes de ciudades a las cuales han migrado desde el campo mujeres infectadas en edad fértil.

Es así como se han notificado casos en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Honduras, Guatemala, Paraguay, Uruguay, Venezuela y Colombia¹. Por ejemplo, en Buenos Aires (Argentina), como resultado de la migración desde zonas endémicas, la infección se detecta en un 2,6 a 6,7% de las mujeres embarazadas²⁴.

La incidencia de la transmisión transplacentaria de la enfermedad de Chagas oscila entre 1 al 10% en diferentes zonas geográficas, incluso en un mismo país¹. Por ejemplo, en Brasil se ha reportado una incidencia del 1%¹, en Uruguay del 0,5 al 3,5%²⁵, en algunas regiones de Bolivia y Paraguay se han encontrado incidencias > 7%¹, y en Chile la incidencia varía entre el 16 al 28% dependiendo de la localidad³.

En Colombia, aun cuando se estima que 700.000 personas residentes en las áreas endémicas se encuentran infectadas y un 23% de la población en general se encuentra en riesgo de adquirir la infección¹, no existen reportes de estudios de infección materna por *T. cruzi*, así como tampoco de la transmisión transplacentaria de esta enfermedad.

Este trabajo presenta la prevalencia en maternas y la incidencia en RN de la enfermedad transplacentaria en los municipios de Miraflores y Moniquirá de Boyacá, municipios que representan zonas de alta endemia. Adicionalmente, se presenta una evaluación de los métodos diagnósticos usados para la detección de la infección, así como también la eficacia del tratamiento en RN colombianos y la presentación de reacciones secundarias adversas.

Materiales y métodos

Tipo de estudio

El estudio "Enfermedad de Chagas transplacentaria en los municipios de Miraflores y Moniquirá, Boyacá", tuvo 3 fases en 2 diseños, uno de corte transversal y el segundo longitudinal. En la primera de ellas se realizó, como prueba de tamización, serología mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) en muestra de sangre tomada en papel de filtro a mujeres embarazadas de los municipios de Miraflores y Moniquirá en el segundo o último trimestre del embarazo, según la metodología del Instituto Nacional de Salud (INS)²⁶ y protocolo estandarizado. En la segunda fase, se hizo la confirmación serológica del diagnóstico en las madres mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI, en inglés *indirect immunofluorescence*) y ELISA en muestras de suero²⁶ y toma de muestras para diagnóstico parasitológico, por microhematocrito, hemocultivo y PCR^{15,17,26-28} a las madres seropositivas y a sus hijos; y en la tercera fase, se realizó el tratamiento de los niños infectados. En los casos en que se encontraron hemocultivos positivos, se realizó PCR para identificación taxonómica de los aislamientos de *T. cruzi*²³.

Población de estudio

Se trabajó en los municipios de Miraflores y Moniquirá, los cuales constituyen zonas de alta endemia para la enfermedad de Chagas.

En la primera fase del estudio, se incluyó a las mujeres embarazadas que asistían a control prenatal durante un año a los hospitales Regional San José y Hospital Elías Olarte que cumplan los criterios de inclusión, y firmaron un consentimiento informado en conjunto con su pareja. Los criterios de inclusión fueron: mujeres embarazadas que asistan a control prenatal en los municipios objeto de estudio. A todas las mujeres se les tomó una muestra de sangre capilar en papel de filtro para la realización de la prueba tamiz ELISA, la cual se realizó en el laboratorio del Grupo de investigación en Salud Pública, Universidad Politécnica y Tecnológica de Colombia, según el procedimiento establecido por el Laboratorio de Parasitología, INS²⁶. Las madres positivas fueron confirmadas mediante IFI y ELISA en suero, pruebas que se realizarán en el Laboratorio de Parasitología del INS, Bogotá.

Se calculó una muestra de 826 (600 a 950) mujeres embarazadas en ambos municipios durante el año de estudio, según indicadores históricos de control prenatal y atención del parto. En la segunda fase del estudio, se estudiaron tanto los niños RN de las madres positivas para la infección como sus respectivas madres. Se esperaba una muestra de 95 (25 a 165) madres positivas para la infección. Todos los niños se evaluaron clínicamente, pesados, y se les tomó una muestra de 2,0 ml de sangre, entre el séptimo y décimo día de nacimiento, para realizar las pruebas de microhematocrito, hemocultivo e IFI, las cuales fueron realizadas en el Laboratorio de Parasitología, INS, y las pruebas de PCR que se realizaron en el Laboratorio de Parasitología Molecular, Pontificia Universidad Javeriana. Teniendo en cuenta una incidencia de infección transplacentaria de 3-20%, al año se estimó en ambos municipios de 9 (3 a 19) RN infectados.

El criterio de positividad fue determinado por el grupo de investigadores y la asesora internacional de la Universidad de Chile en cuanto a que los RN positivos son aquellos que tienen

resultado parasitológico positivo en las pruebas de microhematocrito, hemocultivo o PCR, estos deberían ser tratados inmediatamente, y a los negativos se les repetirán todas las pruebas entre los 8 y 10 meses de nacidos para descartar definitivamente la infección. Finalmente, en la tercera y última etapa del estudio, los niños RN infectados fueron sometidos a tratamiento de la infección y seguimiento de la respuesta al mismo. A los niños se les tomó una muestra de 2,0 ml de sangre periférica, antes de iniciar el tratamiento, al finalizarlo, y a los 4, 8 y 12 meses después de terminado el tratamiento, para realizar las pruebas de microhematocrito, IFI, PCR en tiempo real y convencional.

Pruebas serológicas

La prueba tamiz de ELISA en papel de filtro y las pruebas confirmatorias de IFI y ELISA en suero se realizaron según lo descrito por Beltran²⁶ usando como antígeno la cepa colombiana MHOM/CO/03/CG de *T. cruzi*.

Pruebas parasitológicas

Se realizaron la prueba de microhematocrito²⁹ y hemocultivo. Los hemocultivos se hicieron con muestras de sangre anticoagulada con citrato de sodio de la madre a los 9 meses de gestación, y de su hijo, a los 2 y 4 meses del nacimiento. Se sembraron, aproximadamente, 1,5 ml de cada muestra en 3 tubos con medio Tobie para la madre y 2 tubos para el bebé³⁰. Los hemocultivos se observaron en microscopio invertido cada 8 días después del día de siembra.

Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa

A partir de las muestras de sangre y de las cepas aisladas de los hemocultivos positivos de madres e hijos, se obtuvo el ADN con los métodos que utilizan clorhidrato de guanidina, en el caso de las muestras de sangre, o NP40 al 10% para las cepas aisladas en cultivo, seguido de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. La cuantificación y el análisis de la calidad del ADN se hicieron por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa. El ADN obtenido de cada cepa fue amplificado con la PCR TcH2AF-R^{15,28} para confirmar la presencia de *T. cruzi*. Para identificar el grupo correspondiente a cada cepa, se realizó la PCR basada en el gen miniexón que utiliza los iniciadores TC/TCI/TCII²³. Como controles del grupo I de *T. cruzi*, se utilizaron las cepas IRHO/CO/98/Munantá y MHOM/CO/07/H/SEV, procedentes de Guateque y Monquirá, Boyacá, y MHOM/CO/86/MR de Chiriguana, Cesar; como controles del grupo II de *T. cruzi*, se utilizaron la cepa colombiana *P. geniculatus*/CO/98 (subgrupo IIb) procedente de Amalfi, Antioquia, las cepas de Brasil CAN III (subgrupo IIa), IRHO/BR/84/Y (subgrupo IIb) y CL Brener (subgrupo IIe), y la cepa venezolana Maracay (subgrupo IIe)¹³. La intensidad de los fragmentos amplificados se determinó mediante densitometría en el fotodocumentador de geles Gel DocTM EQ, utilizando el programa Quantity One, versión 4.5 (BIO-RAD).

Arbitrarily Primed-Polymerase Reaction Chain

Para analizar los genotipos de las cepas aisladas en el hemocultivo, se amplificó cada muestra por *Arbitrarily Primed-Polymerase Reaction Chain* con un cebador de 20 bases,

correspondiente a una región del gen de la β -globina¹⁰ y otra reacción con el cebador inverso de 21 bases del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S³¹. Las condiciones de reacción y el programa de amplificación se hicieron de acuerdo con lo descrito por Welsh y McCheland en 1990³², con algunas condiciones optimizadas en el laboratorio. Los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1,6% teñidos con bromuro de etidio y analizados con el programa Quantity One, versión 4.5 (BIO-RAD), teniéndose en cuenta solamente la presencia o ausencia de los fragmentos reproducibles e inequívocos obtenidos con cada uno de ellos, al menos, en 3 ensayos diferentes. Los perfiles obtenidos se usaron para construir dendrogramas, usando el análisis de agrupación jerárquica mediante la media aritmética no ponderada.

Tratamiento y seguimiento de los recién nacidos

Los RN positivos fueron tratados con 5-8 mg/kg/peso/día de benzonidazole (Rochagan[®]), por vía oral y administrado después de las comidas, en 2 dosis diarias durante 60 días^{8,9,33}. Los niños prematuros o con bajo peso iniciaron el tratamiento con la mitad de la dosis durante 72 h, al cabo de las cuales se administró la dosis total. Se considerarán como positivos los niños que presenten positividad en al menos una de las siguientes pruebas: microhematocrito, hemocultivo o PCR. Adicionalmente, la PCR se considerará positiva cuando al menos 2 de las 3 pruebas aplicadas sean positivas y cuando además de los fragmentos esperados de amplificación, los controles de las pruebas se comporten de acuerdo con lo esperado.

También, a los RN tratados se les realizó exámenes clínicos semanales, control de peso y talla, observación de aparición de síntomas adversos colaterales y análisis de laboratorio como hemograma, creatinina, transaminasas y parcial de orina al inicio, a la mitad y al final del tratamiento. Asimismo, los niveles de parasitemia fueron examinados antes de iniciar el tratamiento, al finalizar el mismo, y a los 4, 8 y 12 meses después de terminado el tratamiento, mediante microhematocrito, PCR en tiempo real y la prueba de PCR señalada anteriormente.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Se realizó con el fin de cuantificar la carga parasitaria en los niños RN tratados según lo indicado anteriormente. Para ello, se amplificó la secuencia de 195 pb del ADN satelital del parásito según lo descrito por Cummings & Tarleton en 2005, usando el estuche comercial Qiagen Quanta Teca Sybr Green PCR (Quiagen). Como estándar externo se utilizó el fragmento de ADN amplificado debidamente purificado y cuantificado.

Análisis estadístico

Los datos fueron consignados en un formulario de recolección de datos individual precodificado, de forma independiente y ciega. Se realizó una base de datos en computador utilizando el programa EPIINFO 2002. El análisis estadístico tuvo por objeto describir en primera instancia las proporciones de infección de las madres en los municipios de Miraflores y Monquirá, de Boyacá y su respectiva comparación. En segundo lugar, se determinaron las incidencias de la enfermedad de Chagas transplacentaria en los RN de los municipi-

pios bajo estudio y su respectiva comparación. También, se estudió la concordancia entre las diferentes pruebas aplicadas mediante el índice Kappa y se calcularon las proporciones de las características operativas (sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo) de la prueba ELISA en papel de filtro en la detección de infección por *T. cruzi* en embarazadas, usando como patrón de oro el binomio IFI/ELISA. De igual manera, se analizaron las concordancias entre las pruebas de microhematocrito, hemocultivos y PCR. Asimismo, se realizó un estudio descriptivo de las características clínicas, talla, peso y reacciones adversas de los niños tratados. Finalmente, se analizó la eficacia del tratamiento, así como también la adherencia al mismo. El análisis de datos se llevó a cabo a través del programa estadístico Epiinfo y SPSS 11.5. Se procedió a la descripción de las características sociodemográficas de la población de estudio previa evaluación de la distribución de las variables del estudio y los cálculos de las variables anteriormente mencionadas.

Resultados

La edad media de las participantes en el estudio fue de 24,7 años (desviación estándar) DS 6,7; el mínimo, 14 años y edad máxima de 43 años.

Se programó, según el diseño maestral, un reclutamiento de 826 maternas (600 a 950) en los 2 municipios, se logró un total de 702 participantes de las cuales se procesaron 659 muestras (358 de Moniquirá y 301 de Miraflores), mediante técnicas de ELISA en papel de filtro, y se confirmaron las positivas con ELISA en suero, IFI, hemocultivo y PCR.

Se logró incluir a 689 maternas en el estudio, de las cuales en 11 la muestra resultó insuficiente para el tamizaje, se perdieron o se dañó la muestra en el transporte de 19 de ellas, quedando 659 muestras tamizadas en la primera fase del estudio a través de papel filtro.

El análisis se presenta solo con las maternas en las que fue posible obtener resultados de ELISA en papel de filtro.

De las 659 maternas en *screening*, resultaron positivas a ELISA en papel de filtro 22 de ellas, lo cual indica una positividad para *T. cruzi* de 3,34% (intervalo de confianza 95% 2,2-5,1%). Las positivas ingresaron en el estudio para confirmación del diagnóstico y seguimiento hasta el momento del parto; estas maternas tenían una edad media de 26,5 años DS 5,17 con edad mínima de 17 años y máxima de 38.

La absorbancia registrada en las negativas estuvo entre 0,0030 y 0,3960 para las negativas con una media de 0,16 DS 0,08. De acuerdo con el protocolo de lectura, la absorbancia registrada para las positivas estuvo entre 0,40 y 0,845 con una media de 0,48 DS 0,01 con diferencia estadística significativa $p < 0,01$, como debería esperarse.

La toma de muestras en papel de filtro se inició en Moniquirá y Miraflores en el mes de abril de 2006, luego de elaborar el protocolo de toma y estandarizar la punción digital y las técnicas de conservación y transporte de muestras en papel de filtro.

La prevalencia actual total de la enfermedad de Chagas en maternas es de 3,34% (22/659), 3,99% (12/301) en Miraflores y 2,79% (10/358) en Moniquirá.

Para la confirmación de las muestras maternas, se tomó sangre venosa periférica mediante punción directa según protocolo establecido.

De 22 maternas positivas en la fase de tamizaje, se lograron obtener muestras para confirmación de 18 de ellas mediante las pruebas de ELISA en suero, IFI, hemocultivo y PCR (tabla 1). Las 4 restantes se perdieron por cambio de residencia de las participantes.

Tabla 1 Muestras y resultados procesados por cada técnica en maternas

Técnica	N.º de muestras analizadas	N.º de muestras positivas	% Positividad
ELISA	18	5	27,78%
IFI	18	5	27,78%
HEMOCULTIVO	18	3	16,67%
PCR	17	17	100%

De las 18 maternas en seguimiento, se lograron datos de todos sus RN, de los cuales 6 son positivos para las pruebas de hemocultivo. Se consideró el hemocultivo como la técnica confirmatoria de parasitemia en RN antes de 8 meses, por lo tanto, la incidencia transplacentaria global sería de 33,33% RN positivos/año (6/18) (tabla 2).

Tabla 2 Muestras y resultados procesados por cada técnica en recién nacidos

Técnica	N.º de muestras analizadas	N.º de muestras positivas	% Positividad
ELISA	18	3	16,67%
IFI	18	3	16,67%
HEMOCULTIVO	18	6	33,33%
PCR	17	16	94,12%

La incidencia encontrada en un año de seguimiento es similar a la reportada en Chile (16 al 28%), superior a la de Brasil (1%), Uruguay (0,5 a 3%) y Bolivia y Paraguay (7%).

Teniendo en cuenta los resultados mostrados en la tabla 1, se puede concluir, en cuanto a la utilidad de las pruebas para detectar Chagas transplacentario, que:

- La prueba directa de hematocrito fue totalmente ineficaz, probablemente por falta de acogimiento al protocolo y homogenización del mismo en su realización por parte de los diferentes hospitales.
- A 3 maternas y 6 bebés procedentes de los municipios de Moniquirá y Miraflores se les logró aislar el parásito a partir de muestras de sangre con el anticoagulante citrato de sodio, las cuales fueron cultivadas en medio bifásico Tobie y Lit. A las cepas aisladas de los hemocultivos se les extrajo el ADN, el cual fue amplificado con la PCR TcH2AF-R para confirmar la presencia de *T. cruzi*.
- Para identificar el grupo correspondiente de cada cepa, se realizó la PCR basada en el gen minixón que utiliza los iniciadores TC/TCI/TCII, de acuerdo con lo descrito por Yeo et al., en 2005. Las bandas obtenidas son de 350 y 300 pb correspondientes a los grupos I y II del parásito, respectivamente.
- La reacción de PCR se lleva a un volumen final de 25 μ que contiene 5 μ l del ADN a una concentración final de 250 ng, 1X

de *buffer* de reacción (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM de KCl), 0,625 U/ μ de *Taq* polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 200 μ deoxinucleósidos trifosfato y 0,5 pmol de cada primer. La reacción se corre utilizando el siguiente programa: 94 °C/30 min, 26 ciclos de 94 °C/30 s, 55 °C/30 s y 72 °C/30 s, y una incubación final de 72 °C por 10 min. Diez μ del producto de la reacción se chequea en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio (fig. 1). Dieciocho del ARN ribosomal y del dominio D7 de la subunidad 24, respectivamente (Brisse et al. 2001).

- En todos los aislamientos analizados se obtuvo como producto de amplificación la banda esperada, específica de *T. cruzi*, de 230 pb. Los resultados de la prueba de PCR TC/TCI/TCII mostraron que 6/9 aislamientos pertenecen a cepas del grupo *T. cruzi* I, observándose la banda de amplificación específica de 350 pb, 2/9 al grupo *T. cruzi* II con la amplificación de la banda esperada de 300 pb y 1/9 presentó una mezcla con ambos grupos del parásito.

- Posteriormente, se analizó el subgrupo al que pertenecían las cepas aisladas del grupo *T. cruzi* II con las pruebas de PCR que utilizan los iniciadores V1-V2 y D71-D72, en donde 2 cepas mostraron ser *T. cruzi* IIb con los productos de amplificación específicos de 125 y 165 pb, respectivamente.

- En el caso de la infección mixta, el subgrupo de la cepa *T. cruzi* II mostró ser IIc/d, ya que se amplificaron los fragmentos de 110 y 165 pb.

- De acuerdo con el protocolo de seguimiento y tratamiento, se inició la terapia a un RN luego del tiempo de lactancia, consistente en la administración de 5-8 mg/kg de peso de benzonidazole por día durante 60 días.

- Se practican las pruebas hematológicas, serológicas y parasitológicas además de desinfección y fumigación de vivienda, encontrándose pruebas de laboratorio hepáticas y renales normales con valoración pediátrica y electrocardiograma normal, luego de interrupción del tratamiento tras 1 mes de su aplicación.

- Por aceptación voluntaria de los padres, se inicia el tratamiento en otros 2 de los 6 niños infectados. Sin embargo, los padres deciden suspender el tratamiento tras 15 días de administración por presentación de náuseas y dolor de cabeza en las madres que igualmente habían iniciado el tratamiento; otro factor de no adherencia fue la presentación del fármaco, no propicio para niños.

Vale la pena señalar que, en general, no se presentaron reacciones adversas graves y que tan solo una de las maternas completó el tratamiento, mitad con benzonidazole y mitad con nifurtimox.

Conclusiones

Las cifras hasta ahora obtenidas son superiores a los reportes en Chile (2000) y Brasil (1995); pero inferiores a Bolivia, Argentina y Uruguay.

En concordancia con lo descrito en la literatura, las pruebas serológicas no son criterio diagnóstico, a menos que su positividad se mantenga a los 9 meses de edad. En este estudio en particular, además, no se encontró concordancia entre las muestras positivas por hemocultivo y las positivas por serología.

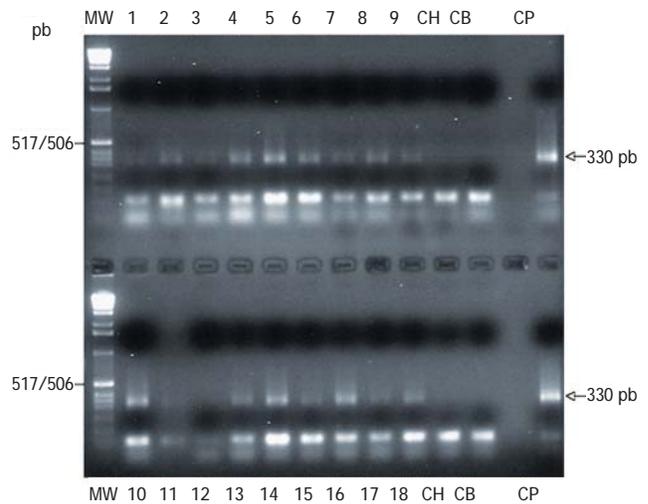


Figura 1 PCR S35-S36. Gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. 1) paciente 08, positivo; 2) paciente 08 diluido (dil) 1/5, positivo, paciente 08, positivo; 3) paciente 08 dil 1/10, positivo; 4) paciente 09, positivo; 5) paciente 09 de 1/5, positivo; 6) paciente 09 dil 1/10, positivo; 7) paciente 010, positivo; 8) paciente 010 dil 1/5, positivo; 9) paciente 010 dil 1/10, positivo; 10) paciente 011, positivo; 11) paciente 011 dil 1/5, positivo; 12) paciente 011 dil 1/10, negativo; 13) paciente 012, positivo; 14) paciente 012 dil 1/5, positivo; 15) paciente 012 dil 1/10, positivo; 16) paciente 013, positivo; 17) paciente 013 dil 1/5, positivo; 18) paciente 013 dil 1/10, positivo. Los controles humano y de reacción son negativos. A la izquierda, se indica el marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen).

Dada la visualización de los parásitos, el hemocultivo se consideró como la prueba confirmatoria diagnóstica, siendo positiva en 6 de 18 RN.

Aun cuando las pruebas de PCR fueron positivas en todos los casos de los RN, dado que su positividad puede obedecer a la presencia de detritos del parásito que pasaron de la madre al feto, mas no a infección activa, se tiene como criterio de apoyo y se recomienda su repetición a los 9 meses de vida de los infantes.

De hecho, en este estudio se pudo evidenciar en 3 RN, a quienes se les tomó muestra en 2 o 3 oportunidades durante su primer año de vida que mientras el RN positivo por hemocultivo presentó pruebas de PCR positivas en todos los muestreos, en el caso de los 2 niños negativos por hemocultivo, sus PCR se negativizaron tras el año de vida.

En conclusión, la transmisión transplacentaria de *T. cruzi* en Colombia se presenta por cepas de ambos grupos del parásito, existiendo además la presencia de infecciones mixtas.

Financiación

Proyecto financiado por COLCIENCIAS. Código del Proyecto: 1109-04-18231. Número del contrato: contrato UPTC-Colciencias RC 439-2005.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigaciones de la Universidad Politécnica y Tecnológica de Colombia y a los jóvenes investigadores Leonardo Cely, Giomar Herrera, Diego Manrique

y Marlon Tejedor; al Grupo de Parasitología del INS, en especial al Dr. Rubén Santiago Nicholls y Marleny Montilla y al Laboratorio de Parasitología de la Universidad Javeriana, a la becaria de Doctorado Paula Pavia.

Bibliografía

- World Health Organization: Control of Chagas Disease: Report of a WHO Expert Committee, Vol. 905. Ginebra: World Health Organization; 2002.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R: The future of Chagas disease control. *Trends in parasitology*. 2006;22:583-8.
- World Health Organization: Control of Chagas Disease: Report of a WHO Expert Committee, Vol. 811. Ginebra: World Health Organization; 1991.
- Lorca M. Enfermedad de Chagas transplacentaria en América Latina. Experiencias de intervención en Chile. En: Guhl F, ed. Primer Taller Internacional Sobre Control de la enfermedad de Chagas, Curso de Diagnóstico, Manejo y Tratamiento de la Enfermedad de Chagas, VI Reunión de la Iniciativa Andina para el Control de la Enfermedad de Chagas. Bogotá: Corcas Editores, 2005; p. 237-40.
- Neto EC, Rubín R, Schulte J, Giugliani R. Newborn screening for congenital infectious diseases. *Emerg Infect Dis*. 2004;10:1068-73.
- Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulián L, Flores I, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in northwestern Argentina. *Tropical Medicine and International Health*. 2000;5:293-301.
- Luquetti A. The National Health Foundation of Brazil etiological treatment for Chagas disease. *Parasitology Today*. 1997;13:127-8.
- Lorca M, Thiermann E. Congenital Chagas disease and its serological diagnosis through conventional serology and methods of molecular biology. En: Erlich R, Nieto A, eds. *Biology of Parasitism*. Montevideo: Ediciones Trilce; 1995; p. 160-6.
- Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, et al. 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 Guillén I, Acosta N, Vera N, Almiron M, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1998;59:487-91.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2003;68:574-82.
- Requena JM, Jiménez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Molecular and biochemical parasitology*. 1992;51:271.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SDJ, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *International journal for parasitology*. 2005;35:411-7.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and biochemical parasitology*. 1993;62:45.
- Silber AM, Búa J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Experimental parasitology*. 1997;85:225-32.
- Pavia P, Cuervo C, Montilla M, Nicholls S, Puerta C. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*; PCR design and standardization for *Trypanosoma cruzi* specific detection. *Infectio*. 2003;7:129-35.
- Dorn PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, et al. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1999;60:740-5.
- Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and biochemical parasitology*. 1989;33:205.
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosomacruzi* and *Trypanosomarangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta tropica*. 1999;72:203-12.
- Veas F, Breniere SF, Cuny G, Brengues C, Solari A, Tibayrenc M. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Cellular and molecular biology*. 1991;37:73.
- Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, et al. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS microbiology letters*. 1994;124:419-23.
- Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2003;129:53-9.
- Anónimo. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. April 11-16. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(Suppl 1):429-32.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, et al. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *International journal for parasitology*. 2005;35:225-33.
- Freilij H, Altcheh J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clinical Infectious Diseases*. 1995;21:551-5.
- Rosa R, Basmadján Y, González Murguiondo M, González Arias M, Salvatella R. Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Rev Med Uruguay*. 2001;17:125-32.
- Gulh F, Nichols RS. Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bogotá, D.C.: Quebecor Impresores; 2001.
- Duque S, Pelaez D, Corredor A. Cultivo in vitro de parásitos de la familia Tripanosomatidae. Manual de Procedimientos. Bogotá: Editorial Instituto Nacional de Salud; 1993.
- Pavia PX, Vallejo GA, Montilla M, Nicholls RS, Puerta CJ. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2007;49:23-30.
- Freilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983;18:327.
- Hypsa V, Dale C. In vitro culture and phylogenetic analysis of "Candidatus Arsenophonus triatominarum," an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1997;47:1140.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 1990;18:7213.
- Zaidenberg M, Segovia A. Enfermedad de Chagas congénita en la ciudad de Salta, Argentina. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1993;35:35-43.