

ARTÍCULO ORIGINAL

Detección molecular de *Trypanosoma cruzi*. Experiencia en un hospital público

Irurtia, María Cecilia; Magdaleno, María Alejandra; Peluffo, Graciela; Di Bartolomeo, Susana; Montenegro, Graciela

¹Laboratorio de Microbiología, Servicio de Bioquímica, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas", Morón, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

Contacto: Irurtia, María Cecilia. Laboratorio de Microbiología, Servicio de Bioquímica, Departamento de Diagnóstico y Tratamiento, Hospital Nacional "Profesor Alejandro Posadas". Presidente Illia y Marconi s/Nro., El Palomar, Morón, Provincia de Buenos Aires, Argentina; bioqceciliairurtia@gmail.com

Resumen

Introducción: el diagnóstico de Chagas agudo, congénito y de reactivación chagásica se basa en la observación microscópica del parásito. Debido a la baja sensibilidad de estas técnicas se han desarrollado métodos de biología molecular para su diagnóstico. **Objetivo:** evaluar la utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección del *Trypanosoma cruzi*. **Materiales y métodos:** se determinó el límite de detección (LoD) a partir de una curva de parásitos y la sensibilidad analítica con diluciones seriadas de ADN de *T. cruzi* usando 2 PCR *in-house*. Se estudiaron 53 muestras de recién nacidos de madres seropositivas para Chagas y 25 de pacientes crónicos con sospecha de reactivación chagásica. Las técnicas utilizadas fueron: micrométodo para sangre, observación microscópica directa para LCR y dos PCR (PCR-ADN kinetoplastídico y PCR-ADN nuclear). **Resultados:** el LoD para ADN nuclear fue 1,45 parásitos/ml (IC 95 %: 1,06 - 3,54) y para ADN del kinetoplasto fue 1,00 parásitos/ml (IC 95 %: 0,76 - 1,77). La sensibilidad analítica en ambas PCR fue de 0,1 fg/μl. En el total de muestras (n = 78), la cantidad de positivos detectados por PCR fueron significativamente mayores que con los métodos directos (33 % vs. 9 %, p < 0,01). El índice de concordancia Kappa entre ambos métodos fue "aceptable" (Kappa = 0,698; p < 0,0001) para recién nacidos y "malo" (Kappa = 0,083; p = 0,299) para pacientes crónicos con sospecha de reactivación chagásica. **Conclusiones:** la sensibilidad de la PCR superó ampliamente a la de los métodos parasitológicos directos. La implementación de las técnicas de biología molecular para detección de *T. cruzi* aumentaría el número de pacientes beneficiados por un tratamiento precoz.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, diagnóstico molecular, PCR, ADN satélite, kinetoplasto.

Abstract

Introduction: the diagnosis of acute and congenital Chagas disease, as well as of Chagas disease reactivation, is based on the microscopic observation of the parasite. Due to the low sensitivity of this technique, molecular methods have been developed for this diagnosis. **Objective:** To evaluate the usefulness of the polymerase chain reaction (PCR) for the detection of *Trypanosoma cruzi*. **Materials and methods:** The limit of detection (LoD) was determined with a curve of parasites and the analytical sensitivity with serial dilutions of *Trypanosoma cruzi* DNA, by using two in-house PCRs. We studied 53 samples from newborns born to mothers who were seropositive for Chagas and 25 from chronic patients with suspected Chagas disease reactivation. The techniques used were: micro-method for blood, direct microscopic observation for CSF and two PCR (kinetoplastic DNA-PCR and nuclear DNA-PCR). **Results:** The LoD for nuclear DNA was 1.45 parasites/ml (CI 95 %: 1.06 - 3.54), whereas that for kinetoplast DNA was 1.00 parasites/ml (CI 95 %: 0.76 - 1.77). The analytical sensitivity in both PCRs was 0.1 fg/μl. In the samples studied (n = 78), the number of positive samples detected by PCR was significantly higher than detected with the direct methods (33 % vs. 9 %, p < 0.01). The Kappa concordance index between both methods was "acceptable" (Kappa = 0.698; p < 0.0001) for newborns and "bad" (Kappa = 0.083; p = 0.299) for chronic patients with suspected Chagas disease reactivation. **Conclusions:** The sensitivity of PCR exceeded that of direct parasitological methods. The implementation of molecular biology techniques for the detection of *T. cruzi* would increase the number of patients diagnosed, who will in turn be benefited by an early treatment.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, molecular diagnosis, PCR, satellite DNA, kinetoplast.

Introducción

La Enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al hospedador vertebrado a través de un vector (triatomino) infectado. Existen otras vías de transmisión no vectoriales como la transplacentaria, transfusión de sangre, trasplante de órganos, ingesta de alimentos contaminados con parásitos y accidentes de laboratorio.

La infección por *T. cruzi* constituye un problema de salud de relevancia social y económica en muchos países de América Latina. Ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 13 enfermedades tropicales desatendidas del mundo [1,2]. La OMS ha estimado, para Latinoamérica, que cerca de 8 millones de personas permanecen hoy infectadas por *T. cruzi*. En nuestro país, habría entre 1.500.000 y 2.000.000 de niños y adultos infectados [3], por lo que se considera la principal endemia. Según datos del Ministerio de Salud de la Nación (Programa Nacional de Chagas) la seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en embarazadas en Argentina fue de 6,8 % en 2000 y 4,84 % en 2010. En base a estos datos, se estima que cada año nacen 1300 niños infectados por transmisión congénita.

En nuestro país, la situación actual de control de Chagas es heterogénea y en las regiones no endémicas existe riesgo de transmisión congénita derivado de las migraciones, lo que también ocurre en otras partes del mundo [4].

Durante el curso de la Enfermedad de Chagas se puede distinguir una fase aguda, caracterizada por una abundante parasitemia, seguida de una fase indeterminada de recuperación, hasta finalmente instaurarse la fase crónica de la enfermedad. Ésta última se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgG específicos y de una parasitemia escasa e intermitente con un curso clínico impredecible, que va desde la ausencia de síntomas hasta una enfermedad severa con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal que pueden ocasionar la muerte [5,6]. Los pacientes con Chagas crónico que sufren algún grado de inmunosupresión (trasplante de órganos, infección por VIH, tratamiento oncológico) pueden presentar una reactivación del *T. cruzi*.

La demostración de la presencia del parásito constituye el diagnóstico de certeza para definir la reactivación de la enfermedad o para el diagnóstico de la infección en los recién nacidos [7]. En etapas posteriores, el diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de anticuerpos específicos [8].

El Ministerio de Salud de la Nación a través del Programa Nacional de Chagas recomienda que el niño recién nacido, hijo de madre infectada sea estudiado en las primeras semanas de vida por métodos parasitológicos directos y a partir de los 10 meses de edad por métodos serológicos [7]. Cabe consignar que 9 de cada 10 niños tratados en fase aguda y 8 de cada 10 niños tratados en la fase crónica negativizan los anticuerpos, lo cual forma parte de los criterios de "curación" [7]. Por tal motivo, la detección temprana del parásito resulta fundamental a la hora de prevenir complicaciones posteriores.

Los métodos parasitológicos directos se basan en la observación por microscopía del parásito y son los comúnmente utilizados ya que pueden ser realizados en laboratorios de baja

complejidad. Debido a la baja sensibilidad de estas técnicas y con el advenimiento de la Biología Molecular se han desarrollado, en los últimos años, una gran cantidad de técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas [9]. Entre estos, se encuentran la PCR para la detección de la región variable del ADN de minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi* y la PCR para la detección de una secuencia de 195 pares de bases del ADN satélite de *T. cruzi*. Estas PCR tienen gran sensibilidad ya que se basan en la amplificación de secuencias repetitivas. A su vez, revisten de una elevada especificidad debido a que sólo amplifican el ADN de *T. cruzi* y no de otros parásitos relacionados [10,11]. Como ambas secuencias se encuentran representadas en un número de copias muy similar, las diferencias en el límite de detección de cada técnica dependen de la optimización de cada reacción.

En muchos trabajos se han realizado comparaciones entre la PCR y los métodos parasitológicos directos para la detección de *T. cruzi* reportándose en todos ellos un incremento de casos positivos por PCR [12-16].

Considerando que el tratamiento temprano presenta grandes beneficios, existe la necesidad de contar con un ensayo sensible, específico y rápido para el diagnóstico de los casos de Chagas agudo, congénito y de reactivación chagásica. Los métodos parasitológicos, aunque precoces y altamente específicos son poco sensibles mientras que los métodos serológicos dan un diagnóstico tardío. Por tal motivo, cobran relevancia las características de las técnicas de biología molecular al combinar alta sensibilidad y especificidad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la utilidad de la detección molecular de *Trypanosoma cruzi* realizando dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), con diferentes cebadores y comparar su capacidad de detección respecto a los métodos parasitológicos directos en pacientes crónicos y en recién nacidos de madre chagásica atendidos en este hospital.

Materiales y métodos

1. Aislado parasitario/curva de parásitos. Se utilizaron epimastigotes de cultivo de *T. cruzi* linaje CLBr, provistos por el Laboratorio de Biología Molecular de La Enfermedad de Chagas-INGEBI, a partir de los cuales se realizaron diluciones seriadas en sangre seronegativa. Para estas se partió de una concentración de 1000 parásitos/ml hecha por recuento en cámara de Neubauer y se realizaron las diluciones de 100, 20, 10, 5, 1 y 0,5 par/ml. De cada dilución se realizaron 9 extracciones del ADN (ver ítem 5) que fueron procesadas acorde a lo descrito más adelante.
2. Curvas de sensibilidad de ADN: partiendo de una alícuota de ADN puro de parásitos, se midió la concentración del mismo a 280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop (EEUU) y luego se realizaron diluciones seriadas en sangre entera anticoagulada con EDTA con serología negativa para Chagas, hasta obtener las siguientes concentraciones: 1000 fg/μl, 100 fg/μl, 10 fg/μl, 1 fg/μl y 0,1 fg/μl. Cada dilución se extrajo según ítem 5 y se realizaron corridas por duplicado.
3. Muestras de Pacientes. Se analizaron 78 muestras con soli-

ciudad médica de parasitemia para Chagas atendidos en este hospital: 53 muestras de sangre de 44 recién nacidos de madres seropositivas para Chagas (RN) y 25 muestras de 11 pacientes chagásicos crónicos. Entre los pacientes crónicos se incluyeron 2 muestras de sangre de pacientes pediátricos inmunosuprimidos (uno con Linfoma + HIV y el otro con leucemia linfocítica aguda) y 17 muestras de sangre y 6 muestras de LCR de 9 pacientes HIV (+) con lesión ocupante de espacio (LOE), compatible con "Chagoma" cerebral. Las muestras pertenecientes a un mismo paciente corresponden a distintos momentos durante el curso del seguimiento médico.

4. Métodos parasitológicos. Se realizó la observación directa al microscopio óptico para los LCR y el micrométodo para sangre [17]. El micrométodo fue adaptado acorde a las siguientes modificaciones: se colocó 1 ml de sangre entera en un tubo estéril y se dejó decantar 24 horas a temperatura ambiente, luego se tomaron 12 gotas de la interfase (zona de glóbulos blancos) y se colocaron entre porta y cubreobjetos. La observación microscópica se realizó en 10X y 40X por microscopía con contraste de fase, recorriendo la totalidad de los campos en los 12 preparados.

5. Extracción de ADN. Se realizó la extracción de ADN de todas las muestras y de las diluciones de parásitos utilizando columnas comerciales (Roche, Mannheim, Alemania), según indicaciones del fabricante y reservando a -20 °C hasta su procesamiento. Se incluyó en cada tanda de extracción un control usando sangre seronegativa.

6. Técnica de PCR para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi* (k-DNA). Se realizó una adaptación del protocolo descrito por Burgos y col. [18], mediante la cual se amplifica una banda de 330 pares de bases (pb) empleando los cebadores 121 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3', y 122 5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGAATATA-3'. Brevemente, las condiciones de reacción fueron: Buffer 1X, desoxinucleotidiotri-fosfato [dNTP] 0,25 mM, cebadores 2,5 µM, cloruro de magnesio 3 mM y Polimerasa 0,75 U (taqPlatinum de Invitrogen con sistema *Hot start*. CA, EEUU) para un volumen final de mezcla de reacción de 25 µl y volumen de muestra de 5 µl. La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: un ciclo inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 68 °C y 45 segundos a 72 °C, luego 35 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 64 °C y 45 segundos a 72 °C, finalmente a 72 °C durante 10 minutos.

7. Técnica de PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* (sat-DNA). Se emplearon los cebadores específicos diseñados por Piron y col. [19]: TC1 5'-ASTCGGCTGATCGTTTCGA-3' y TC2 5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'. Estos cebadores permiten la amplificación de una región repetida de 166 pares de bases del ADN satélite de *T. cruzi*. Durante la puesta a punto de la técnica se optimizaron las condiciones de reacción, las cuales fueron: Buffer 1X, dNTP 0,25 mM, cebadores 0,5 µM, cloruro de magnesio 3 mM y Polimerasa 0.6 U (taqPlatinum de Invitrogen con sistema *Hot start*. CA, EEUU) para un volumen final de mezcla de reacción de 25 µl y volumen de muestra de 5 µl.

La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: un ciclo inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 60 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C y 60 segundos a 72 °C. Todas las técnicas de amplificación se realizaron con el termociclador DNAEngine de BioRad (CA, EEUU).

8. Procedimiento y controles internos. Cada muestra se procesó por duplicado con controles negativos entre cada una, un control de reactivos y tres controles positivos de distinta concentración en cada ensayo. Simultáneamente, se realizó un control de idoneidad de la muestra mediante una amplificación del gen β -actina humana.

9. Electroforesis de ADN en geles de agarosa. La electroforesis se realizó en geles de agarosa (Invitrogen, CA, EEUU) al 2 % utilizando Buffer TAE (Tampón Tris Acetato 40 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0) y un sistema de electroforesis horizontal (Bio Rad, Sub Cell GT, CA, EEUU). Se empleó un voltaje de 90V durante 45 min. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (Bio Basic Inc, Ontario, Canadá). Las bandas de ADN se visualizaron con transiluminador de luz ultravioleta (UV Transilluminator UVP). El tamaño de las bandas de ADN se estimó comparándolas con un marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, CA, EEUU).

10. Análisis estadístico. El LoD se calculó como la carga parasitaria más baja que proporciona ≥ 95 % de los resultados detectables por PCR para ambos blancos moleculares, de acuerdo con las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio [20] adaptadas a los propósitos de este trabajo. El LoD se calculó por análisis de regresión Probit con Minitab 15 Statistical Software (Minitab Inc., 2014, State College, PA, EEUU).

Para la comparación de proporciones se aplicó el test de Fisher y para evaluar la concordancia se calculó el índice Kappa, confeccionando las tablas de contingencia. Se aplicó la escala propuesta por Landis y Koch [21] para la interpretación del índice Kappa. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS 19.0 (IBM, III, EEUU).

Resultados

Cálculo de sensibilidad analítica:

El LoD mediante análisis Probit fue 1,45 parásitos/ml (IC 95 % 1,06 - 3,54) para PCR sat-DNA y 1,00 parásitos/ml (IC 95 % 0,76 - 1,77) para k-DNA (Tabla I).

Las figuras 1 y 2 corresponden a las corridas electroforéticas mostrando los resultados de las amplificaciones. Se observa una banda predominante a la altura de 330 pb para las corridas realizadas con los cebadores de k-DNA y una banda predominante a la altura de 188 pb correspondientes a una unidad de repetición del ADN satélite. Las bandas de peso molecular superior son múltiplos de la unidad de ADN satélite.

La sensibilidad analítica expresada en masa de ADN para los 2 sistemas de amplificación estudiados fue 0,1 fg/µl. Si se considera que un parásito contiene aproximadamente 200 fg de ADN, la sensibilidad analítica determinada en masa de ADN sería equivalente a aproximadamente 0,5 par/ml, lo cual es levemente inferior a los resultados obtenidos en la curva de parásitos.

Figura 1. Productos de amplificación de la PCR para la curva de parásitos de *T. cruzi* [parásitos/ml].

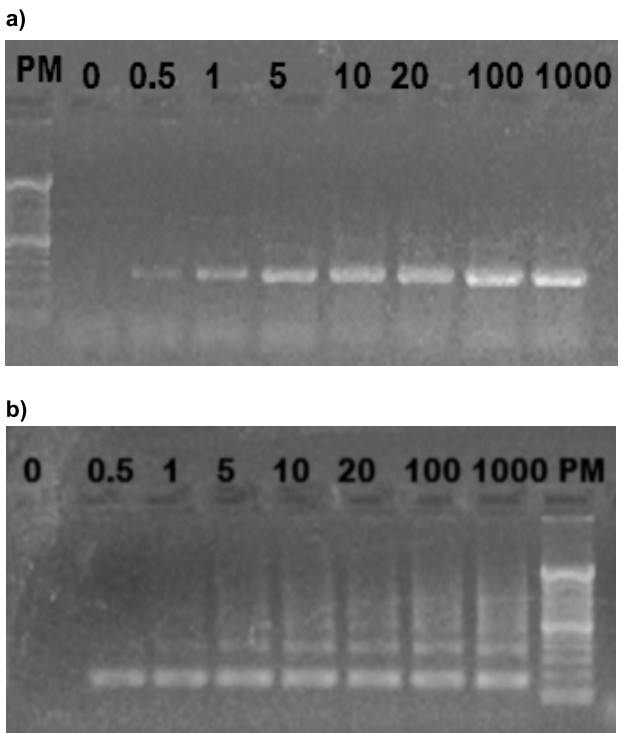
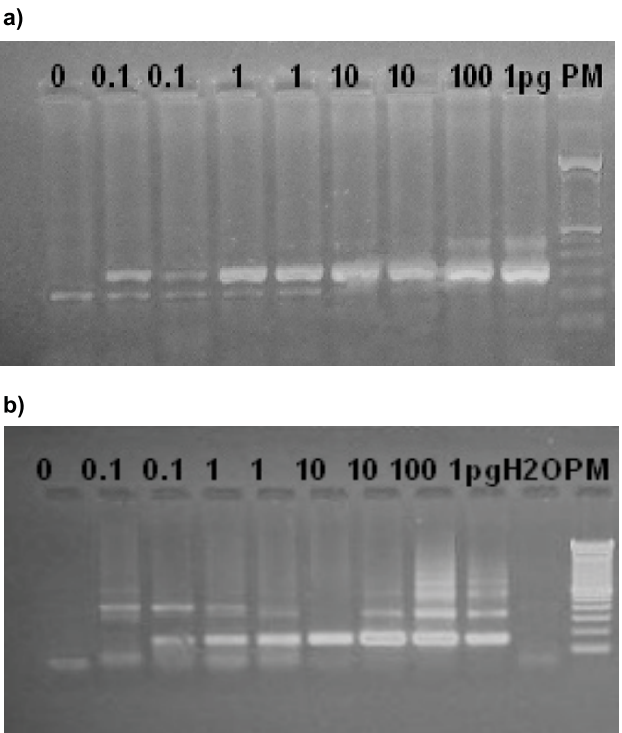


Figura 2. Productos de amplificación de la PCR para la curva de masa de ADN de *T. cruzi* [fg/μl].



► a) con cebadores 121-122 para k-DNA se observa banda a la altura de 330 pb
b) con cebadores TC1 y TC2 para sat-DNA se observa banda a la altura de 188 pb
PM: Marcador de peso molecular de 100 pb

Comparación de los métodos en muestras de pacientes:

Entre las 78 muestras analizadas, 26 presentaron PCR positiva y 7 fueron micrométodo positivo. Es destacable que ninguna de las muestras con micrométodo positivo fue negativa por PCR (Tabla II). El índice Kappa calculado en el total de las muestras fue de 0,329 ($p < 0,0001$), constatando la “regular” concordancia, en general, entre los métodos.

En el grupo de los RN entre las 53 muestras de sangre ana-

lizadas, 7 presentaron PCR positiva y 4 micrométodo positivo (Tabla III). En 9 de los 44 RN se documentaron resultados de 2 muestras en diferentes períodos. Entre ellos se destacó un caso en el que el resultado de la PCR fue positivo al nacer y a los 18 días de vida, mientras que el micrométodo fue positivo solamente en la segunda muestra. La concordancia entre los métodos en este subgrupo de muestras puede considerarse “aceptable” ya que el índice Kappa fue de 0,698 ($p < 0,0001$).

Entre las 25 muestras de pacientes crónicos analizadas, 19 presentaron PCR positiva y sólo 3 fueron positivas por micrométodo. Nuevamente, ninguna de las muestras con micrométodo

Tabla I. Curva de parásitos/ml para las dianas sat-DNA y k-DNA.

Concentración (parásitos/ml)	Réplicas	PCR			
		Sat-DNA		k-DNA	
		Pos	Neg	Pos	Neg
0	9	0	9	0	9
0.5	9	4	5	6	3
1	9	6	3	8	1
5	9	9	0	9	0
10	9	9	0	9	0
20	9	9	0	9	0
100	9	9	0	9	0
1000	9	9	0	9	0

► Pos: Número de ensayos que detectaron ADN de *T. cruzi*; Neg: Número de ensayos que no detectaron ADN de *T. cruzi*.
El análisis Probit arrojó un LoD de 1,45 parásitos/ml [IC 95 % 1,06 - 3,54] para PCR sat-DNA y de 1,00 par/ml [IC 95 % 0,76 - 1,77] para PCR k-DNA.

Tabla II. Resultados de PCR y MM en el total de muestras analizadas [n = 78].

	PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
MM (+)	7	0	7
MM (-)	19	52	71
TOTAL	26	52	78

► PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.
Kappa= 0,329 [IC 95 % 0,135 - 0,524]; $p < 0,0001$.
Grado de acuerdo “regular”.

Tabla III. Resultados de PCR y MM en muestras de recién nacidos (n = 53).

	PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
MM(+)	4	0	0
MM (-)	3	46	49
TOTAL	7	46	53

► PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.

Kappa= 0,698 [CI95 % 0,382 - 1,000]; p < 0,0001.

Grado de acuerdo "aceptable".

Tabla IV. Resultados de PCR y MM en muestras de pacientes crónicos (n = 25).

	PCR (+)	PCR (-)	TOTAL
MM (+)	3	0	3
MM (-)	16	6	22
TOTAL	19	6	25

► PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.

Kappa= 0,083 [CI95 % 0,025 - 0,190]; p= 0,299.

Grado de acuerdo "malo".

positivo presentó PCR negativo (Tabla IV). La concordancia entre los métodos en las muestras de este subgrupo de pacientes fue "mala" (Kappa = 0,083; p = 0,299).

La Tabla V describe en detalle los resultados de los pacientes con sospecha de reactivación chagásica. Al analizar los resultados de los 9 pacientes HIV (+) con LOE, 6 resultaron positivos para *T. cruzi* (3 sólo por PCR y los otros 3 por ambas técnicas). Asimismo, en coherencia con una mayor sensibilidad de las técnicas de biología molecular, durante los controles postratamiento el micrométodo negativizó antes que la PCR. De los 6 LCR estudiados 4 fueron positivos por PCR, de los cuales sólo 1 de ellos presentó microscopía positiva. Los pacientes pediátricos

con compromiso del sistema inmune y serología positiva para Chagas, presentaron ambos PCR positiva y micrométodo negativo (Tabla V).

La figura 3 compara el porcentaje de positividad por la PCR y el micrométodo diferenciando entre pacientes recién nacidos y crónicos. Como se puede observar el número de positivos es significativamente mayor al utilizar la PCR que al utilizar el micrométodo.

Discusión

El resultado más relevante del trabajo fue poder documentar la mayor capacidad de detección de la PCR con respecto a los métodos tradicionales usando muestras de sangre y LCR. Esta mayor sensibilidad se observó tanto en muestras de pacientes crónicos, así como en muestras de recién nacidos de madre chagásica.

El diagnóstico serológico de la infección neonatal por *T. cruzi* se ve impedido debido a la transferencia pasiva de los anticuerpos IgG de la madre. Por otro lado, si bien en la infección congénita suele haber parasitemia, ésta no es siempre detectada por los métodos parasitológicos tradicionales (tal como fue observado en el presente estudio). La PCR, que detecta y amplifica pequeñas cantidades de ADN parasitario, provee una alternativa complementaria para el diagnóstico de esta infección en el neonato y establecer el tratamiento lo más precozmente posible.

En el Hospital Posadas se aconseja tomar dos muestras de sangre en los bebés: una al nacimiento y la otra a las 2 - 4 semanas de vida. De esta manera, se amplía el rango de detección del parásito. En el caso que las dos muestras sean negativas, los bebés deberán estudiarse a los 10 meses de vida por métodos serológicos. En este medio, resulta de suma utilidad el hecho de contar con esta herramienta diagnóstica de alta sensibilidad debido a que la mayoría de los bebés de madre chagásica no vuelven al Hospital para una segunda toma de muestra ni para el control serológico de los 10 meses. Al poder brindar un resultado positivo aún con la primera muestra, más niños podrían ser beneficiados con el tratamiento antiparasitario.

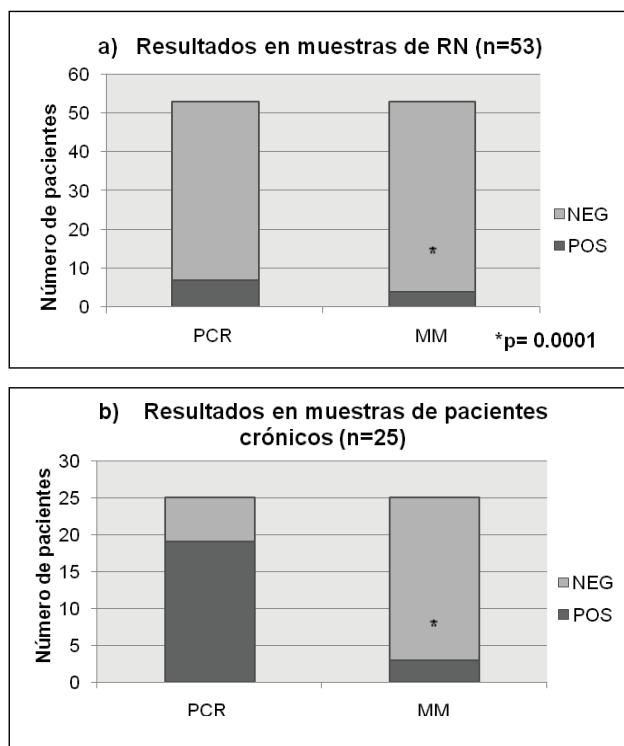
Si bien el tratamiento temprano de la enfermedad de Chagas congénito presenta una buena repuesta terapéutica, con índices de curación cercanos al 100 %, en la actualidad se descono-

Tabla V. Detalle de resultados de PCR y MM de pacientes crónicos con sospecha de reactivación chagásica (n=11).

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	MUESTRA	MM*	PCR
CF	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	NEG
HS	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
Tto		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
RR	HIV (+) / LOE	Sangre	POS	POS
Tto		Sangre	NEG	POS
SN	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
		LCR	POS	POS
MN	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
		LCR	NEG	POS
GR	HIV (+) / LOE	LCR	NEG	POS
LR	HIV (+) / LOE	LCR	NEG	NEG
SS	HIV (+) / LOE	LCR	NEG	NEG
BM	HIV (+) / LOE	Sangre	NEG	POS
Tto		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	POS	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	POS
		Sangre	NEG	NEG
		Sangre	NEG	NEG
		LCR	NEG	NEG
SA	LLA-T	Sangre	NEG	POS
GA	HIV + Linfoma no Hodking	Sangre	NEG	POS

► NEG, negativo; POS, positivo; tto, inicio del tratamiento; LOE, lesión ocupante de espacio, PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo. *Para LCR se realiza microscopía directa. Se consideró PCR (+) a aquellas muestras que fueron positivas en las dos reacciones evaluadas.

Figura 3. Resultados de las muestras por biología molecular y métodos directos acorde al tipo de paciente.



► NEG, negativo; POS, positivo; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MM, micrométodo

*p= 0.0002

ce la eficacia del tratamiento durante la fase crónica de la infección. Hasta el momento, el consenso sobre el criterio de “cura” comprende la negativización de las pruebas serológicas [22]. Sin embargo, la negativización de los títulos de anticuerpos en los pacientes crónicos no ocurre antes de 8 o 10 años después del tratamiento y en una proporción de pacientes no superior al 15 %. Por lo tanto, es necesario el uso de nuevos marcadores que permitan determinar la disminución de la carga parasitaria o la eliminación completa del parásito después del tratamiento. En los últimos años, la detección de ADN mediante la PCR y la PCR en tiempo real se ha convertido en las mejores alternativas [23].

Los límites de detección determinados en ambas PCR están dentro de los parámetros considerados adecuados para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*, según los criterios propuestos en un estudio internacional de PCR para Chagas, aplicado a casos de infección reciente por Chagas congénito y de reactivación chagásica por inmunosupresión [9]. El LoD obtenido se encuentra dentro del rango publicado, el cual abarca el intervalo 0,005 – 5,000 parásitos/ml, al igual que el valor obtenido para sensibilidad analítica expresada en masa de ADN, el cual, también, se halla dentro de los valores publicados (0,01 - 1,00 fg/μl) [9]. En este aspecto, se destaca la optimización de las condiciones de reacción para adaptar las técnicas de biología molecular a las condiciones de trabajo en este laboratorio.

La concordancia obtenida en el grupo de los recién nacidos fue “aceptable”, mientras que en el grupo de los pacientes crónicos fue “mala”. Esto se debe a que en general las parasitemias suelen ser más bajas en la etapa crónica de la enfermedad, y por lo tanto más difícilmente detectables por observación microscópica.

Una de las limitaciones de este trabajo es que no se contó con la serología a los 10 meses de los bebés, consecuentemente la tasa de falsos positivos de PCR no pudo ser determinada. No obstante, para realizar este trabajo se minimizaron los riesgos de contaminación (principal fuente de falsos positivos en este tipo de técnicas) utilizando las áreas separadas del laboratorio de biología molecular, los controles de reactivos y el control negativo de extracción en cada ensayo. Asimismo, se consideraron como positivas sólo aquellas muestras que fueron positivas por ambas técnicas de PCR. De este modo, es asumido que la tasa de falsos positivos fue nula o al menos mínima.

En conclusión, estos resultados muestran una mayor sensibilidad de la PCR respecto a los métodos tradicionales y son similares a los de publicaciones previas [16-24-27]. Por tal motivo, el presente trabajo permite aconsejar el uso de la PCR en el diagnóstico de la infección congénita y reactivación chagásica.

Agradecimientos: Al Dr. Darío Siciliani, médico del Servicio de Epidemiología del Hospital Prof. A. Posadas, por sus aportes y a la Dra. Silvia Balconi, jefa del servicio de Bioquímica, por su apoyo. Un agradecimiento especial al Dr. Tomás Meroño por su asesoramiento para la publicación de este trabajo.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Referencias bibliográficas

- Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: The Global Burden of Disease Framework. Brooker S, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2007;1(2): e114.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. New Engl J Med. 2007;357:1018–1027.
- Jannin J, Salvatella R. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Panamericana de la Salud 2006; OPS/HDM/CD/425-06, 28 pp.
- Fumadó V, Juncosa T, Posada E, Fisa R, Gállego M, Gascón J. Chagas pediátrico en zona no endémica. Enferm Infecc Microbiol Clin 2014;32(5):293–296.
- Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis 2001;1(2):92-100.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto J A. Chagas disease. Lancet 2010;375:1388-402.
- Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2012.
- Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA y Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. Enf Inf Microbiol Clin 2013;31 Suppl 1:26-34.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR

- methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *Plos negl trop dis* 2011;5: e931.
10. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51(6):771-777.
11. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27(7):1477-1482.
12. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34(5):1171-1175.
13. Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59(3):487-491.
14. Schijman AG, Altcheh 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. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(3):441-449.
15. 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. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68(5):574-582.
16. Lucero RH, Brusés BL, Merino DE, Fernandez G. Enfermedad de Chagas congénito en Hospitales de la ciudad de Corrientes-Argentina. *Enf Emerg*. 2007;9(3):121-124.
17. De Rissio A, Riarte A, García M, Esteva M, Quaglini M. Ruiz A. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non endemic area of Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82: 838-845.
18. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2007;37:1319-1327.
19. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007; 103:195-200.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification: Approved Guideline. Wayne, Pennsylvania: NCCLS; 2004.
21. Landis J, Koch G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977;33:159-74
22. Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(1):331-335.
23. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(1):122-135.
24. Mora MC, Sanchez Negrette O, Marco D, Barrio A, Ciaccio M, Segura MA, et al. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J Parasitol*. 2005;91:1468-1473.
25. Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, et al. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serology and parasitological diagnosis. *Parasitology*. 1997;114:367-373.
26. Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, et al. Usefulness of PCR Strategies For Early Diagnosis of Chagas' Disease Reactivation and Treatment Follow-Up in Heart Transplantation. *Am J Transplant*. 2007; 7(6):1633-1640.
27. Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*. 1995;110:241-247.