

## Diagnóstico

### ENFERMEDAD DE CHAGAS

#### Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en un área no endémica

E. Dopico<sup>1</sup>, E. Grenzner<sup>1</sup>, I. Ubillos<sup>1</sup>, E. Sulleiro<sup>2</sup>, C. Riera<sup>3</sup>, T. Vinuesa<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratori Clínic L'Hospitalet, Institut Català de la Salut, Barcelona, España

<sup>2</sup> Servei de Microbiologia, Hospital de la Vall d'Hebrón, Barcelona, España

<sup>3</sup> Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, España

<sup>4</sup> Unitat de Microbiologia, Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Barcelona España

**Introducción.** El diagnóstico de la enfermedad de Chagas está basado esencialmente en pruebas serológicas, ya que los métodos parasitológicos directos carecen de la sensibilidad necesaria.

**Objetivos.** Valorar diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, así como los resultados obtenidos en el primer año de cribado serológico en mujeres gestantes latinoamericanas.

**Material y métodos.** Este estudio se llevó a cabo en el Laboratori Clínic l'Hospitalet (Institut Català de la Salut), entre marzo de 2008 y mayo de 2011, en pacientes con sospecha de enfermedad de Chagas. En mayo del 2010 se inició un protocolo de cribado serológico en mujeres embarazadas latinoamericanas (excepto por las islas del Caribe).

Paraladetección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* se utilizó inicialmente una técnica de IFI (IFA Immunofluor Chagas, Biocientífica SA®) y un EIA recombinante (r-EIA, Bioelisa Chagas Biokit®); posteriormente, se sustituyó la IFI por un EIA nativo (n-EIA, Ortho® T.cruzi Elisa Test System) y, a partir de la implantación del protocolo de cribado, se practicó sólo un r-EIA con confirmación de los positivos por n-EIA, utilizándose Western blot en caso de discordancia.

**Resultados.** De los 2.971 sujetos estudiados, 439 presentaban resultados positivos, 420 (95,7 %) por dos técnicas (IFI/r-EIA o r-EIA/n-EIA) y 19 (4,32 %) por una sola. Los resultados discordantes presentaban valores inferiores a 3,5 veces el punto de corte.

De los 19 sueros discordantes, se realizó Western blot en 16, siendo 4 (25 %) positivos, 8 (50 %)

negativos y 4 (25 %) indeterminados. Entre las personas estudiadas había 1.350 mujeres embarazadas, y en 31 se diagnosticó enfermedad de Chagas, sin presencia de infección congénita, por el momento.

**Conclusiones.** Para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, creemos que se puede utilizar sólo una técnica de cribado (IFI, n-EIA o r-EIA) y se confirman los resultados positivos con una segunda técnica. El Western blot es útil para resolver los resultados discordantes que habitualmente presentan valores positivos bajos.

• • •

#### Reproducibilidad del inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas al comparar tres cepas de *Trypanosoma cruzi*

Andrés Florido<sup>1</sup>, Pilar Castillo<sup>1</sup>, Marleny Montilla<sup>2</sup>, Carolina Flórez<sup>3</sup>, Zulma M. Cucunubá<sup>2</sup>, Lyda Muñoz<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** El inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas plantea un importante reto. Algunos autores han sugerido que los problemas de concordancia en el diagnóstico obedecen a diferencias en la procedencia de las cepas, su mantenimiento y procesamiento, y a variabilidad en la respuesta inmunitaria del huésped. Además, se sugiere que existe diferencia en la lectura de las pruebas intraobservador y entre observadores.

El objetivo de este estudio fue determinar la concordancia y reproducibilidad del inmunodiagnóstico de la enfermedad Chagas al comparar tres cepas de *Trypanosoma cruzi*, mediante dos técnicas diferentes y con dos observadores independientes.

**Materiales y métodos.** Mediante las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA, y utilizando antígenos fijados de epimastigotes de *T. cruzi*, se evaluaron las diferencias en la reacción en los anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* con tres cepas (MMUS/CH//73/Tulahuén, MHOM/CO/10/SMA y MHOM/CO/07/NV). Se seleccionaron 45 muestras distribuidas en cuatro grupos de pacientes: 10 crónicos sintomáticos, 10 crónicos asintomáticos,

15 negativos con factores de riesgo y 10 dudosos. El procesamiento y lectura fueron realizados por dos observadores independientes que desconocían los resultados del inmunodiagnóstico previo. El análisis estadístico se realizó por medio del coeficiente de concordancia kappa con un intervalo de confianza del 95 % (IC<sub>95%</sub>).

**Resultados.** La concordancia entre ELISA e IFI fue la siguiente: cepa Tulahuen, kappa=0,86 (IC<sub>95%</sub>: 0,71-1,00); cepa NV, kappa=0,72 (IC<sub>95%</sub>: 0,53-0,92); cepa SMA, kappa=0,65 (IC<sub>95%</sub>: 0,44-0,86). La reproducibilidad entre observadores para la prueba IFI fue la siguiente: cepa Tulahuen, kappa=0,95 (IC<sub>95%</sub>: 0-86-1,0); cepa NV, kappa=0,95 (IC<sub>95%</sub>: 0,85-1,0); cepa SMA, kappa=0,59 (IC<sub>95%</sub>: 0,36-0,82).

**Conclusiones.** Se concluye que existen diferencias importantes para la concordancia y reproducibilidad entre observadores del inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Estas diferenciales pueden obedecer a características biológicas diferenciales entre las cepas de *T. cruzi*. Se requieren estudios más amplios para corroborar esta situación y plantear alternativas para mejorar el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas.



### Antígenos de relevancia para el diagnóstico diferencial de la fase indeterminada y la crónica de la enfermedad de Chagas

Elia Torres-Gutiérrez, Martha Bucio-Torres, Margarita Cabrera-Bravo, Yolanda Guevara-Gómez, Mariana De Alba-Alvarado, Dalía Barrios-Palacios, Edgar Zenteno-Galindo, Carlos Zamora-González, Paz María Salazar-Schettino

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.C., México.

Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chavez", México, D.C., México.

**Introducción.** La enfermedad de Chagas presenta diferentes formas clínicas, desde asintomática hasta la forma cardiaca grave. *Trypanosoma cruzi* presenta una amplia oferta antigénica; sin embargo, se desconocen los factores que influyen en la evolución de la enfermedad.

Los objetivos del presente trabajo fueron: caracterizar bioquímicamente un extracto antigénico del parásito, identificar componentes inmunodominantes y determinar si es posible detectar por *Western blot* un patrón característico de la fase crónica sintomática.

**Materiales y métodos.** Se realizó electroforesis de proteínas en una y dos dimensiones; en una

dimensión se realizaron las tinciones *Sypro Rubi* y *ProQ Emerald* para detectar proteínas y glucoproteínas. Por cromatografía de gases y *Western blot* revelado con lectinas, se determinó la composición de carbohidratos y su distribución en el patrón electroforético.

Se practicó *Western blot* revelado con sueros de individuos jóvenes provenientes de San Luis Potosí, seropositivos para *T. cruzi* (ELISA e inmunofluorescencia indirectas) y caracterizados clínicamente en el Instituto Nacional de Cardiología.

**Resultados.** Se identificaron 13 componentes glucoproteicos entre 250 y 13 kDa de un extracto soluble de *T. cruzi*. Se identificó la N-acetilglucosamina como principal monosacárido (63 %) y se identificaron diversas fracciones con reacción positiva a lectinas. En electroforesis de doble dimensión se encontraron cerca de 300 puntos con pesos moleculares entre 250 y 13 kDa y pl de 4,5 a 7.

En el *Western blot* de los sueros se identificaron diversos componentes antigénicos, destacando los de 38, 34 y 27 kDa reconocidos por el 100 % de los seropositivos.

**Conclusiones.** Se concluye que los componentes del extracto están constituidos principalmente por glucoproteínas, tres de las cuales se proponen para su uso en técnicas de diagnóstico. No fue posible determinar componentes específicos de fase clínica, pero se encontró una asociación entre la presencia de alteraciones electrocardiográficas y un mayor reconocimiento de componentes antigénicos.



### Diagnóstico molecular de coinfección tripanosomiasis americana-leishmaniasis en reservorios de zonas endémicas venezolanas

Elizabeth Ferrer<sup>1,2</sup>, Cruz Manuel Aguilar<sup>3</sup>, Antonio Morocoima<sup>4</sup>, Mercedes Viettri<sup>1</sup>, María Lares<sup>1</sup>, Rina Briceño<sup>1</sup>, María Gabriela Rivera<sup>1</sup>, Mariela López<sup>1</sup>, Leidi Herrera<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela

<sup>2</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela

<sup>3</sup> Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, San Carlos, Cojedes, Venezuela

<sup>4</sup> Centro de Medicina Tropical de Oriente, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona, Venezuela

<sup>5</sup> Instituto de Zoología Tropical, Facultad de Ciencias,

Universidad Central de Venezuela, Caracas,  
Venezuela

**Introducción.** El diagnóstico de la tripanosomiasis americana y la leishmaniasis en animales reservorios de zonas endémicas de estas infecciones es difícil de hacer, debido a parasitemias bajas y a la reacción cruzada en los métodos inmunológicos. El diagnóstico molecular es una alternativa, ya que se han diseñado varias PCR con gran sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de estas infecciones, por lo que el objetivo del trabajo fue aplicar el diagnóstico molecular por PCR en posibles reservorios.

**Materiales y métodos.** Se aplicó la técnica para la detección de ADN de cinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* (PCR-ADNk) y la PCR para la detección del ADN codificante del ARN de la subunidad pequeña ribosómica (PCR-SSUrRNA) de *Leishmania* sp. en muestras de sangre en papel de filtro de 97 posibles reservorios: 42 *Equus asinus*, 36 *Canis familiaris* y 19 *Didelphis marsupiales* de zonas endémicas para ambas zoonosis, de los estados Anzoátegui (oriental) y Cojedes (centro-occidente) como marcadores moleculares de infección única y de coinfección.

**Resultados.** De las 42 muestras de *E. asinus*, 6/42 (14,3 %) resultaron positivas por PCR-ADNk, mientras que 11/42 (26,2 %) eran positivas por PCR-SSUrRNA. La infección para esta especie fue 2,4 % (1/42). En cuanto a *C. familiaris*, 16/36 (44,4 %) estaban positivos por PCR-ADNk y 28/36 (77,8%) eran positivas por PCR-SSUrRNA, siendo la coinfección en esta especie de 13/36 (36,1 %). En cuanto a *D. marsupiales*, 10/19 (52,6 %) eran positivos por PCR-ADNk y 8/19 (42,1 %) positivos por PCR-SSUrRNA y la coinfección en esta especie fue de 6/19 (31,6 %). El mayor porcentaje de coinfección se encontró para *C. familiaris* con mayor prevalencia para el estado Anzoátegui.

**Conclusiones.** Estos resultados sugieren una elevada coinfección en los reservorios estudiados para ambos parásitos y la necesidad de profundizar en la superposición de nichos para ambas zoonosis en las regiones estudiadas.

**Financiamiento.** Proyectos: Proyecto en Red Misión Ciencia MPPCTII N° 2008000911-6, Proyecto FONACIT N° G-2005000827, Ayuda Menor CDCH-UC N° 0450-10 y PROYECTO LOCTI-Universidad de Carabobo.

• • •

## Eficiencia de la técnica de electroinmunotransferencia o Western blot para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el Perú

Hermes Escalante-Añorga, Kelly Davelois-Atac, William Reyes-Vega  
Universidad Nacional de Trujillo/Laboratorio Escalabs S.A.C., Trujillo, Perú

**Introducción.** La enfermedad de Chagas es una parasitosis potencialmente mortal, cuyo diagnóstico indirecto se basa en el uso de por lo menos dos técnicas serológicas diferentes y, cuando existe un conflicto entre ellas, sugieren una tercera prueba confirmatoria con alto valor de especificidad.

Está comprobada la eficiencia de la técnica Western blot como prueba confirmatoria en el diagnóstico de algunas enfermedades; por lo tanto, su utilización en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas es de notable importancia por mejorar la especificidad, característica de la que carecen las técnicas actualmente empleadas.

El objetivo del estudio fue determinar la eficiencia de la técnica Western Blot con antígenos de excreción/secreción de epimastigotas de *T. cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el Perú.

**Materiales y métodos.** Se emplearon antígenos de excreción/secreción de epimastigotas de *T. cruzi* obtenidos a las 18 horas en medio MEM-Eagle y sueros controles positivos y negativos a esta enfermedad de 182 sueros, de los cuales, 110 pertenecían a pacientes con enfermedad de Chagas procedentes de Bolivia y Arequipa en Perú; 67 sueros de pacientes con otras parasitosis (36 de leishmaniasis, 10 de toxoplasmosis, uno de malaria, cinco de hidatidosis, cinco de cisticercosis, uno de toxocariosis, cinco de estrongiloidosis, cuatro de anquilostomidosis y cinco de sueros negativos de personas sanas.

**Resultados.** Un *pool* de sueros positivos reconocieron 18 bandas antigénicas comprendidas entre 10 y 120 kDa; las bandas 13, 15, 20, 26, 30 y 33 kDa se consideraron específicas por no ser reconocidas por los sueros de pacientes con otras parasitosis y los de personas sanas, con una sensibilidad de 93,64 %, especificidad de 100 %, un valor diagnóstico positivo de 100 % y un valor diagnóstico negativo de 91,14 %.

**Conclusión.** La técnica de Western blot utilizando antígenos de excreción-secreción de epimastigotas de *T. cruzi* es muy específica y confiable para ser utilizada en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en el Perú.

## PCR como marcador molecular de infección por *Trypanosoma cruzi* en posibles reservorios de zonas endémicas venezolanas

Leidi Herrera<sup>1</sup>, Cruz Manuel Aguilar<sup>2</sup>, Antonio Morocoima<sup>3</sup>, Mercedes Viettri<sup>4</sup>, María Lares<sup>4</sup>, Rina Briceño<sup>4</sup>, María Gabriela Rivera<sup>4</sup>, Mariela López<sup>4</sup>, Elizabeth Ferrer<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, San Carlos, Venezuela

<sup>3</sup> Centro de Medicina Tropical de Oriente, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona, Venezuela

<sup>4</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela

<sup>5</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, sede Aragua, Maracay, Venezuela

**Introducción.** El diagnóstico de la tripanosomiasis americana, o enfermedad de Chagas en posibles reservorios, es difícil de realizar, debido a las bajas parasitemias propia de estos huéspedes. La técnica de PCR ha demostrado tener una gran sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la tripanosomiasis americana.

El objetivo del trabajo fue utilizar la PCR para la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi*.

**Materiales y métodos.** Se utilizó PCR para la amplificación de las secuencias variables de minicúrculos de cinetoplasto de *T. cruzi* (PCR-ADNk), en muestras de sangre recolectada en papel de filtro de reservorios sospechosos del Estado Anzoátegui y del Estado Cojedes, en el oriente y el occidente de Venezuela, respectivamente. Se analizaron 117 muestras de sangre de: 42 *Equus asinus* (burros), 36 *Canis familiaris* (perros), 19 *Didelphis marsupialis* (rabilpelados), 8 *Equus mulus* (mulas), 5 *Felis catus* (gatos), 4 *Equus caballus* (caballos), 2 *Bos taurus* (vacas) y 1 *Sciurus granatensis* (ardilla).

**Resultados.** De las 117 muestras evaluadas, 33,3 % resultaron positivas por la PCR; las especies con mayor proporción de positividad fueron: *S. granatensis* (100 %), *D. marsupialis* (52,6 %), *B. taurus* (50 %), *C. familiaris* (44,4 %), *E. mulus* (37,5 %), *E. caballus* (25 %), *F. catus* (20 %) y *E. asinus* (14 %). Destaca, además de la conocida importancia de *D. marsupialis* como reservorio primario, y de animales domésticos, como el perro y el gato, la participación de ejemplares de la ganadería, como

vacas, burros y mulos, reservorios que no habían sido referidos para *T. cruzi*, así como la participación del animales silvestres, como la ardilla, manejados como mascotas en cautiverio, todos ellos atractivos para los triatominos vectores.

**Conclusiones.** La técnica de PCR permitió conocer un espectro más amplio de potenciales reservorios que estarían participando en los ciclos de transmisión en las áreas referidas.

**Financiamiento.** Proyectos: Proyecto en Red Misión Ciencia MPPCTII N° 2008000911-6, Proyecto FONACIT N° G-2005000827, Ayuda Menor CDCH-UC N° 0450-10 y PROYECTO LOCTI-Universidad de Carabobo.

• • •

## Contenido intestinal de triatominos para la identificación de *Trypanosoma cruzi* y fuente alimentaria del vector

Leidi Herrera<sup>1</sup>, Glenda Ruiz<sup>1</sup>, Antonio Morocoima<sup>2</sup>, Zoraida Díaz-Bello<sup>3</sup>, Cruz Manuel Aguilar<sup>4</sup>, Mariela López<sup>5</sup>, Elizabeth Ferrer<sup>5,6</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

<sup>2</sup> Centro de Medicina Tropical de Oriente, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Barcelona, Venezuela

<sup>3</sup> Instituto de Medicina Tropical Felix Pifano, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

<sup>4</sup> Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo. San Carlos, Venezuela

<sup>5</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Carabobo, sede Aragua, Maracay, Venezuela

<sup>6</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, sede Aragua, Maracay, Venezuela

**Introducción.** El xenodiagnóstico sobre reservorios y los exámenes directos de contenido intestinal de triatominos vectores, son las técnicas clásicas para el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* (agente etiológico de la enfermedad de Chagas), el aislamiento del parásito y la implicación de mamíferos como potencial fuente alimentaria para los triatominos. Aunque el xenodiagnóstico puede resultar positivo hasta seis meses después de haberse realizado en animales con parasitemias escasas, generalmente su sensibilidad es baja.

El objetivo del trabajo fue determinar la presencia de ADN de *T. cruzi* por PCR en contenido intestinal de triatominos y determinar la posible fuente alimentaria de los mismos.

**Materiales y métodos.** Se utilizaron para extracción

de ADN y la amplificación de ADN del cinetoplasto por PCR, el contenido intestinal de triatomíneos de xenodiagnóstico negativo (n=100) con seis meses hasta dos años de anterioridad en papel de filtro, y triatomíneos recolectados (63) de áreas endémicas de Venezuela. Además, se utilizaron 115 triatomíneos recolectados para determinar la fuente alimentaria utilizando ELISA con anticuerpos anti-conejo, anti-ratón, anti-rata, anti-gallina, anti-caballo, anti-perro y anti-humano.

**Resultados.** El 54 % de los triatomíneos recolectados y 45 % de los xenodiagnósticos negativos resultaron positivos por PCR. Se observó participación de *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus* y *Rhodnius prolixus*, como vectores de *T. cruzi*, y algunos mamíferos como fuente alimentaria de estos (perro, conejo, roedores, vacas y, eventualmente, humanos) en ecótopos venezolanos.

**Conclusiones.** Los resultados demuestran el valor epidemiológico retrospectivo de este análisis con material preservado procedente del vector preservado desde hace dos años en la identificación de *T. cruzi* y su correspondiente fuente alimentaria.

**Financiamiento.** Proyectos: Proyecto en Red Misión Ciencia MPPCTII N° 2008000911-6, Proyecto FONACIT N° G-2005000827 y PROYECTO LOCTI-Universidad de Carabobo.

## Métodos moleculares y serológicos en el diagnóstico de infección con *Trypanosoma cruzi* en la fase crónica de la enfermedad de Chagas

Luisa Duarte, Óscar Flórez, Giovanna Rincón, Clara Isabel González

Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

**Introducción.** La enfermedad de Chagas es causada por la infección con el parásito *Trypanosoma cruzi*. La OMS estima que alrededor de 15 millones de personas están infectadas en Latinoamérica. En Colombia la prevalencia de infección es de 5 %, aunque en áreas endémicas de Santander se presenta en cerca de 50 %. El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* es prioritario para determinar el riesgo de transmisión. Sin embargo, durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas el diagnóstico de la infección se hace mediante métodos inmunológicos acompañados de criterios clínicos y epidemiológicos, debido a la limitación de la baja o intermitente parasitemia de los métodos parasitológicos y moleculares.

El objetivo de este trabajo fue determinar el desempeño de algunas pruebas serológicas y moleculares y su valor diagnóstico en la infección por *T. cruzi* en pacientes con cardiomiopatía chagásica crónica.

**Materiales y métodos.** El estudio incluyó 214 muestras de personas residentes en Santander, 100 muestras de pacientes con diagnóstico clínico y epidemiológico de con enfermedad de Chagas y 114 muestras de individuos sanos. El diagnóstico de la infección se hizo mediante métodos serológicos (ELISA casero, ELISA con antígenos/péptidos recombinantes, hemoaglutinación e inmunocromatografía) y moleculares (amplificación por PCR del kDNA y stDNA). Se determinaron las probabilidades condicionales (sensibilidad, especificidad, VPP y VPN), la capacidad discriminatoria (curva ROC) y la calidad para cada una de las pruebas (índice kappa) utilizando el *software* Stata 10.0.

**Resultados.** Los métodos serológicos, en comparación con los métodos moleculares, presentaron mayores valores en las probabilidades condicionales (sensibilidad, 0,63-0,99 Vs. 0,14- 0,61), así como también en la capacidad discriminatoria (0,82- 1,00 Vs. 0,57-0,80) y la concordancia (0,73-0,97 Vs. 0,23-0,53).

**Conclusiones.** En términos generales, de todos los métodos evaluados, las pruebas serológicas basadas en antígenos/péptidos recombinantes presentaron el mejor desempeño diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.



## PCR en tiempo real en deyecciones de *Triatoma infestans*: nueva alternativa de control externo

Nicolás Bravo, Catalina Muñoz, Nicolás Nazal\*, Miguel Saavedra, Gabriela Martínez, Eduardo Araya, Werner Apt, Inés Zulantay

Laboratorio de Parasitología Básico Clínico, Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile,

\* Gene X-Press, Chile

**Introducción.** Hasta la fecha, no existen reportes de aplicación de la PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatomíneos alimentados sobre pacientes crónicos con enfermedad de Chagas (xenodiagnóstico).

**Objetivo.** Evaluar la utilidad de un fragmento del cromosoma humano que codifica a CD4 (hCD4) como control externo de qPCR aplicada en

muestras de xenodiagnóstico (qPCR-XD).

**Materiales y métodos.** Se extrajeron y purificaron mediante un kit comercial (Favorgen®) —modificado para mejorar la extracción de ADN, con dos eluciones con 50 µl de solución tampón e incubado a 56 °C durante 10 minutos para un volumen final de 100 µl— muestras de sangre periférica de individuos sin enfermedad de Chagas y deyecciones de triatomíneos de xenodiagnóstico obtenidos a los 30, 60 y 90 días de incubación.

Utilizando un fluoróforo de unión a ADN de doble hebra, en el equipo Mx3000P™ Stratagene, se cuantificaron muestras de ADN sanguíneo para su posterior adición, en una cantidad arbitraria, a muestras de deyección, que fueron posteriormente purificadas con el mismo método descrito. La mezcla de reacción para qPCR estuvo compuesta por los oligonucleótidos hCD4 fw y hCD4 rv, Brilliant III Ultra Fast SYBR® Green QPCR Master Mix, las muestras descritas y agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo en el equipo mencionado con un perfil térmico predeterminado y la obtención de la correspondiente curva de disociación. En cada reacción se incluyeron controles para hCD4 positivos y negativos.

**Resultados.** No se detectó la presencia de hCD4 en las muestras de ADN de deyecciones, mientras que en las muestras de ADN de sangre periférica humana y en su combinación con las deyecciones, se evidenció la amplificación de hCD4.

**Conclusiones.** Se propone el uso de ADN humano para la detección de hCD4, como control externo de reacción para qPCR en los estudios que utilicen deyecciones de triatomíneos alimentados sobre pacientes crónicos con enfermedad de Chagas.

**Financiamiento.** Proyecto Fondecyt 1100768

• • •

### **Detección de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en mujeres gestantes con enfermedad de Chagas de los departamentos de Boyacá y Casanare**

Paula Pavía<sup>1</sup>, Zulma M. Cucunubá<sup>2</sup>, Marleny Montilla<sup>2</sup>, Carolina Flórez<sup>2</sup>, Rubén Santiago Nicholls<sup>2</sup>, Concepción Puerta<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** *Trypanosoma cruzi* puede ser transmitido al feto de una mujer gestante infectada a través de la placenta. En Colombia, estudios previos han demostrado que la prevalencia de la enfermedad de Chagas en mujeres gestantes en Boyacá y Casanare, es de 3,9 y 4,0 %, respectivamente.

Como parte del proyecto “Desarrollo e implementación de un programa piloto de vigilancia de Chagas congénito en Colombia” en el que uno de los objetivos es evaluar los diferentes métodos diagnósticos, en este trabajo se presentan los resultados obtenidos por PCR en un grupo de mujeres gestantes con confirmación serológica de la infección.

**Materiales y métodos.** A 44 mujeres gestantes con pruebas de ELISA e IFI reactivas, 34 residentes en Casanare y 10 en Boyacá, se les tomó una muestra de sangre y se extrajo el ADN con los estuches comerciales *High Pure PCR Template Preparation Kit®* (Roche) y *QIAamp DNA Purification Mini Kit®* (Qiagen). El ADN se amplificó con los iniciadores S35-S36 y los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se utilizaron los iniciadores  $\alpha$ -globina F-R para corroborar la calidad del ADN y descartar la presencia de inhibidores de la PCR. Se determinó el nivel de detección del parásito de la prueba PCR para este grupo de muestras.

**Resultados.** Mediante la PCR S35-S36 se pudo detectar al parásito en 20 de las 44 mujeres gestantes, para un nivel de detección de 45,5 %. En Casanare, 18 de 34 mujeres gestantes (52,9 %) fueron positivas, mientras que en Boyacá tan sólo 2 de 10 fueron detectadas por esta técnica (20,0 %). En ninguna de las muestras analizadas se observaron inhibidores de la PCR.

**Conclusiones.** El bajo nivel de detección del parásito mediante la prueba de PCR convencional en las mujeres gestantes, sugiere un bajo desempeño de la prueba para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad crónica de Chagas en mujeres gestantes en áreas endémicas de baja prevalencia. No obstante, se requieren más estudios para confirmar este hecho.