

# Deteccción de *Trypanosoma cruzi* en tejido y sangre murina por PCR convencional y en tiempo real

*Detection of Trypanosoma cruzi in murine blood and tissue by conventional and real time PCR*

*Detecção de Trypanosoma cruzi em tecido e sangue murinos por PCR convencional e em tempo real*

- Carolina Davies<sup>1a</sup>, Ramiro Hugo Poma<sup>2b</sup>, Rubén Marino Cardozo<sup>3c</sup>,  
María Celia Mora<sup>4a</sup>, Federico Ramos<sup>5a</sup>, Verónica Beatriz Rajal<sup>6b</sup>,  
Miguel Ángel Basombrío<sup>7a</sup>

<sup>1</sup> Lic. en Biología, MSc, PhD en Farmacia y Bioquímica.

<sup>2</sup> Lic. en Genética, PhD en Ingeniería.

<sup>3</sup> Lic. en Biología, PhD en Biología.

<sup>4</sup> Médico Veterinario.

<sup>5</sup> Técnico Universitario en Laboratorio de Histopatología.

<sup>6</sup> Ing. Química, PhD en Ingeniería.

<sup>7</sup> Médico, PhD en Medicina.

<sup>a</sup> Instituto de Patología Experimental, CONICET – Universidad Nacional de Salta.

<sup>b</sup> Laboratorio de Aguas y Suelo - Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI, CONICET-UNSa) y Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Salta.

<sup>c</sup> Programa de Enfermedades por Vectores y Otros Reservorios, Dirección General de Coordinación Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública, Salta, Argentina.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstracts Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (Impresa)

ISSN 1851-6114 (En línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue comparar la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en tiempo real (qPCR) y PCR convencional en sangre periférica ( $n=25$ ) y músculo esquelético ( $n=20$ ) de ratones tratados con drogas tripanomicidas luego de 6 meses post-tratamiento. En las muestras de sangre se detectaron un total de 7 positivas por qPCR, mientras que por PCR convencional sólo se detectaron 2. En músculo esquelético, 15 muestras fueron positivas por qPCR y 3 por PCR convencional. Los resultados obtenidos demuestran que la fuerza de concordancia es débil entre las técnicas de PCR utilizadas para la detección de ADN de *T. cruzi* ( $k=0,37$ ; 49% positivas por qPCR vs. 11% por PCR convencional,  $p=0,0001$ ). En las muestras de sangre, los valores diagnósticos de qPCR con respecto a la PCR convencional fueron: 100% sensibilidad; 78% especificidad; 30% VPP; 100% VPN; 4,6 RVP; 0 RVN. Para las muestras de músculo esquelético se obtuvieron los siguientes valores diagnósticos de qPCR: 100% sensibilidad; 29% especificidad; 20% VPP; 100% VPN; 1,4 RVP; 0 RVN. Ambas técnicas fueron igualmente sensibles en el rango de mediana-alta concentración, pero qPCR fue más efectiva para detectar bajas cargas parasitarias, en particular en las muestras de tejido.

**Palabras clave:** PCR convencional \* PCR en tiempo real \* ratones \* carga parasitaria \* sangre periférica \* músculo esquelético \* *Trypanosoma cruzi*

## Summary

The aim of this work was to compare detection of *Trypanosoma cruzi* DNA by real time (qPCR) and conventional PCR in peripheral blood ( $n=25$ ), and skeletal muscle ( $n=20$ ) of mice treated with trypanocidal compounds after

6 months post-treatment. A total of 7 blood samples were positive by qPCR; whereas, by conventional PCR only 2 were detected. In skeletal muscle, 15 samples were regarded positive by qPCR and 3 by conventional PCR. These results showed a weak concordance strength among PCR techniques employed to detect *T. cruzi* DNA in the studied samples ( $\kappa=0.37$ ; 49% positives by qPCR vs. 11% by conventional PCR,  $p=0.0001$ ). In blood samples, qPCR diagnostic values in comparison with conventional PCR were: 100% sensibility; 78% specificity; 30% PPV; 100% NPV; 4.6 PVR; 0 NVR. For skeletal muscle samples, qPCR diagnostic values were: 100% sensibility; 29% specificity; 20% PPV; 100% NPV; 1.4 PVR; 0 NVR. Both techniques were equally sensitive in the medium-high concentration range, but qPCR was more effective to detect low parasitic burden, particularly in skeletal muscle samples.

**Key words:** conventional PCR \* real time PCR \* mice \* parasitic burden \* peripheral blood \* skeletal muscle \* *Trypanosoma cruzi*

## Resumo

O objetivo deste estudo foi comparar a detecção de DNA de *Trypanosoma cruzi* por PCR em tempo real (qPCR) e PCR convencional no sangue periférico (N=25) e músculo esquelético (N= 20) de camundongos tratados com medicamentos tripanomicidas depois de 6 meses de pós-tratamento. Nas amostras de sangue foi detectado um total de sete positivas por qPCR; enquanto que apenas foram encontradas 2 por PCR convencional. No músculo esquelético, 15 amostras foram positivas por qPCR e 3 por PCR convencional. Os resultados mostram que a força de concordância é fraca entre as técnicas de PCR utilizadas para a detecção de DNA de *T. cruzi* ( $\kappa=0,37$ , 49% positivas por qPCR vs. 11% para a PCR convencional,  $p=0,0001$ ). Nas amostras de sangue, os valores diagnósticos de qPCR em relação a PCR convencional foram de 100% sensibilidade; 78% de especificidade; 30% de VPP; 100% VPN; 4,6 RVP; 0 RVN. Para as amostras de músculo esquelético, os seguintes valores diagnósticos de qPCR foram obtidos: 100% sensibilidade; 29% de especificidade; 20% de VPP; 100% VPN; 1,4 RVP; 0 RVN. Ambas as técnicas são igualmente sensíveis na faixa de concentração média-alta, mas qPCR foi mais eficaz na detecção de baixas cargas parasitárias, especialmente em amostras de tecido.

**Palavras-chave:** PCR convencional \* PCR em tempo real \* camundongos \* carga parasitária \* sangue periférico \* músculo esquelético \* *Trypanosoma cruzi*

## Introducción

La técnica de PCR amplifica fragmentos específicos de ADN, detectados principalmente por dos métodos diferentes. En la PCR convencional el ADN se detecta mediante la iluminación de un gel de agarosa por luz UV, mientras que en la PCR en tiempo real o cuantitativa (*quantitative*, qPCR), la detección se basa en la fluorescencia acumulada a lo largo de los ciclos de amplificación. La fluorescencia, directamente relacionada con la cantidad de amplicones, puede ser generada por agentes intercalantes como SybrGreen o por la liberación de los fluoróforos de las sondas de nucleótidos específicos (1). El ciclo umbral (*cycle threshold*, Ct) es la medida cuantitativa que identifica el ciclo de amplificación en el cual la cantidad de fluorescencia es superior a un determinado umbral. Una cuantificación absoluta requiere de una curva estándar que relaciona el logaritmo de la concentración de diluciones sucesivas de ácidos nucleicos con sus Cts. De esta manera, se deduce la concentración de ácidos nucleicos en muestras incógnitas a partir de la curva estándar (2). Además, el análisis de las temperaturas de fusión, una característica única

de la química de SybrGreen, incrementa el poder de discriminación entre secuencias (3) (4).

Las secuencias de nucleótidos no codificantes repetidas en *tandem*, llamadas satélites, constituyen fuentes de variación genética y en *Trypanosoma cruzi* pueden ser características de diferentes aislados (5). Además, este parásito hemoflagelado también presenta moléculas de ADN circular extracromosómico llamadas minicírculos, encontradas en grandes cantidades en el kinetoplasto (en el orden de las 10.000 por célula) y cuyas secuencias, de rápida evolución, también son características de diferentes cepas (6) (7). Moser *et al* (7) describieron las ventajas de amplificar secuencias de satélites genómicos sobre la amplificación de secuencias del minicírculo kinetoplástico para detectar *T. cruzi* mediante PCR. En primer lugar, el mayor número de copias en los satélites genómicos provee mayor sensibilidad. En segundo lugar, la disposición lineal de los satélites, en contraste con los minicírculos de ADN superenrollados en el kinetoplasto, facilita tanto el apareamiento de los *primers* con su región complementaria específica como el crecimiento de la cadena de nucleótidos por la polimerasa (5) (7). A su vez, ambos puntos disminuyen la probabi-

lidad de reacciones cruzadas y aumentan la especificidad. Sin embargo, para el diagnóstico molecular de la infección por *T. cruzi* existe un acuerdo internacional para emplear el par de *primers* 121-122 -que amplifica una región de minicírculo kinetoplástico- en PCR convencional, mientras que en el diagnóstico por qPCR se utilizan *primers* de un satélite genómico (8).

La combinación de baja carga parasitaria y fuerte respuesta antigénica durante la fase crónica hacen de la serología el *gold standard* para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Las pruebas parasitológicas (parasitemia, xenodiagnóstico, hemocultivo) son útiles cuando muestran un resultado positivo. Por el contrario, un resultado negativo en un *test* parasitológico no es considerado como criterio de cura en ausencia de resultados serológicos, especialmente durante la fase crónica (9) (10). En combinación con la serología, la PCR representa una herramienta de diagnóstico temprano y un indicadora de éxito terapéutico en casos de transmisión congénita (11) (12). La qPCR ya es ampliamente utilizada por diversos autores para cuantificar la carga parasitaria de *T. cruzi* en modelos murinos, abarcando desde muestras de tejidos (13) (14), líquido amniótico (15) y tejido conjuntivo (16). Caldas *et al.* (17) validaron la técnica de qPCR frente a métodos serológicos y parasitológicos convencionales, encontrando una fuerte correlación entre ellos.

Bastien *et al.* (18) describieron a la PCR como un método que abarca varias técnicas con muchas variables que influyen los resultados, y en el presente trabajo se revisó esta hipótesis para el diagnóstico de *T. cruzi* por PCR. El modelo murino de infección por *T. cruzi* cuenta con protocolos de PCR convencional y qPCR estandarizados para la detección de ADN del parásito en muestras de sangre y tejido. El objetivo del presente trabajo fue comparar las técnicas de PCR convencional y qPCR en las mismas muestras a partir de una única extracción de ADN, pero con diferentes volúmenes de reacción, reactivos, regiones blanco y termocicladores de acuerdo con el protocolo de cada técnica.

## Materiales y Métodos

*Diseño experimental.* Se emplearon ratones Swiss hembra de un mes de edad, infectados intraperitonealmente con  $10^3$  tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepa Tulahuén, DTU VI (19). Los grupos de 5 animales recibieron aleatoriamente alguno de los siguientes tratamientos: BZL (benznidazol, 60 mg/kg/día), NFOH (hidroximetilnitrofurazona, 150 mg/kg/día), NF (nitrofurazona, 150 mg/kg/día), o placebo (vehículo, solución de 9% NaCl-5% Tween 80). Los tratamientos fueron administrados por vía oral una vez al día durante 6 días por semana hasta completar 60 días de tratamiento. Al finalizar los 6 meses post-tratamiento los ra-

tones fueron sacrificados para la obtención de muestras de sangre y tejido, siguiendo las reglas internacionales de cuidado animal (20), en un protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Salta. Se analizaron 25 muestras de sangre y 20 de tejido, ya que a 5 ratones no se les pudo sacar muestras de tejido.

*Muestras de sangre.* Se recolectó un volumen de 700  $\mu$ L de sangre periférica en un tubo con 1400  $\mu$ L de *buffer* guanidina (guanidina-HCl 6 M, EDTA 200 mM, pH 8,0). Un día después de completar el volumen final, las muestras fueron hervidas durante 10 min para lisar las células y evitar la formación de coágulos, y se guardaron a 4 °C hasta su procesamiento.

*Muestras de tejido.* Se extrajo una sección de aproximadamente 25 mg de músculo esquelético, que fue inmediatamente guardada a -20 °C hasta el momento de la extracción del ADN.

*Control interno.* Para evaluar la eficiencia de la extracción de ADN y la reacción de PCR, la extracción de ADN se realizó agregando un control interno (CI). Con este fin, el plásmido pZErO-Kan (Invitrogen, obtenido gracias al Dr. Duffy) que contenía un fragmento de ADN genómico de 195 pb de *Arabidopsis thaliana*, se incluyó en la extracción de ADN. El fragmento fue amplificado con los *primers* específicos "forward" 5'-AACCGTCATGGAA-CAGCACGTAC-3' y "reverse" 5'-CTAGAACATTGGCTC-CCGCAACA-3' (21). Se realizó una curva de calibración del plásmido para determinar la dilución óptima a utilizar en los ensayos con las muestras de sangre murina. Se modificó ligeramente el protocolo de Duffy *et al.* al elegir una dilución con un Ct de 20 (1:1.000 a partir del *stock* de ADN plasmídico) porque esta dilución se encontraba dentro del rango de detección lineal de la curva de calibración.

Para las muestras de músculo esquelético se utilizó el gen *TNF- $\alpha$*  como control interno porque se encuentra presente en una única copia por célula, y de esa manera permite calcular el número de parásitos/célula en forma directa (22).

*Extracción de ADN.* Para las muestras de sangre se utilizó el *kit* QIAamp® DNA Mini Kit for Tissue and Body Fluids (Qiagen, Valencia, EE.UU.). De acuerdo con las instrucciones del fabricante, se emplearon 200  $\mu$ L de sangre, a los que se agregaron 20  $\mu$ L de la dilución de CI. Debido a que las muestras fueron tomadas en *buffer* de guanidina, el *buffer* de dilución de muestras del *kit* (que contiene guanidina) no fue empleado para evitar un exceso en la concentración de este inhibidor de la polimerasa. Para aumentar la concentración final de ADN, se realizaron dos eluciones de 50 y 75  $\mu$ L con agua bi-distilada, obteniendo un volumen final de 125  $\mu$ L.

La extracción de ADN de linfocitos para la curva de calibración de *TNF- $\alpha$*  se realizó con el *buffer* del equipo

porque se trataba de una alícuota de células suspendidas en medio de cultivo.

El ADN de las muestras de tejido se extrajo con Pure-Link™ Genomic DNA Kits (Invitrogen, Life Sciences). Para facilitar la disrupción tisular y disminuir el tiempo de incubación en el *buffer* con proteinasa K, cada muestra se colocó en un criotubo y se sumergió en N<sub>2</sub> líquido por unos minutos, e inmediatamente después se maceró con una varilla de vidrio estéril hasta observar la ruptura del tejido. Luego se agregó el *buffer* correspondiente y se procedió según el protocolo indicado por el fabricante.

#### CURVAS DE CALIBRACIÓN

**Sangre:** Se utilizó sangre periférica de un ratón sano, sin infección por *T. cruzi*, obtenida como se describió más arriba. A la muestra de sangre sana se le agregó una alícuota de epimastigotes de cultivo axénico de la cepa Tulahuén, contados en cámara de Neubauer, para obtener una concentración final de 10<sup>6</sup> parásitos/mL, y se le agregó una alícuota de CI. Luego de la extracción del ADN, se realizaron diluciones sucesivas en un factor de 10 en el rango de 10<sup>6</sup> a 10<sup>3</sup> parásitos/mL. Estas diluciones fueron empleadas como puntos de la curva de calibración necesarios para la cuantificación de la secuencia blanco en las muestras incógnitas.

**Linfocitos:** Se utilizó el mismo protocolo de sangre, pero sin el agregado de *A. thaliana*. Para ello se extrajo el bazo de un ratón sano, sin ningún tipo de infección, y se aislaron los linfocitos por perfusión del órgano con RPMI helado, se transfirió la solución obtenida a un tubo de 15 mL, se incubó 5 minutos en hielo para luego centrifugar a 1500 rpm (10 min), y se descartó el sobrenadante. Los hematíes se eliminaron por *shock* hipotónico al resuspender el *pellet* en 1 mL de agua destilada estéril, incubando por 15 s y lavando 2 veces con PBS. Los linfocitos obtenidos se resuspendieron en RPMI con 50% de suero fetal bovino, realizando una dilución de 10<sup>6</sup> células/mL para extraer el ADN. La curva de calibración se realizó con diluciones sucesivas en factor 10 en el rango 10<sup>6</sup> a 1 células/mL. La cantidad de células nucleadas presentes en la muestra de tejido analizada se calculó según la curva de calibración de *TNF-α* expresando los resultados como número de parásitos/10<sup>5</sup> células (22).

**PCR convencional.** Se emplearon los *primers* 121 (5'-AAA TAA TGT ACG GG (T/G) GAG ATG CAT GA-3') y 122 (5'-GGT TCG ATT GGG GTT GGT GTA ATA TA-3'). Este par de *primers* amplifica un fragmento de 330 pb del minicírculo kinetoplástico. La mezcla de amplificación contenía 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega); 0,2 mM dNTPs; 0,1 μM de cada *primer* (Sigma); 1,65 unidades de polimerasa GoTaq (Promega) y 10 μL de ADN. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador M. J. Research (Watertown, Massachusetts, EE.UU.) en las

siguientes condiciones: *hot start* a 94 °C por 2 min; 98 °C por 1 min, y 64 °C por 2 min, seguidos por 33 ciclos de 94 °C por 1 min y 64 °C por 2 min, con un paso de elongación final a 72 °C por 10 min. El fragmento de 330 pb fue detectado por luz UV en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

**qPCR.** Se utilizaron los *primers* Sat-F (5'-GCAGTCGGC-KGATCGTTTTTCG-3') y Sat-R (5'-TTCAGRGTTGTTT-GGTGTCCAGTG-3') (21) para determinar la presencia de ADN de *T. cruzi* en sangre y tejido. Estos *primers* amplifican un fragmento de un satélite genómico de 146 bp, repetido aproximadamente 10<sup>4</sup> veces en la cepa Tulahuén (5) (23). El elevado número de copias aumenta la sensibilidad de la técnica permitiendo la detección de fragmentos de parásitos en niveles menores a 1 parásito/mL, que pueden definirse como "equivalentes de parásitos".

Las concentraciones de cada reactivo fueron empleadas según lo sugerido por el fabricante de SybrGreen (Invitrogen, Life Sciences): 1X Master Mix, 1000 nM de cada *primer* (Sigma) y 5 μL de ADN, en un volumen final de 25 μL por pocillo. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) en los siguientes pasos: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, y 1 min a 63 °C. Luego de la PCR, se agregó un protocolo de disociación de amplicones a partir de 60 °C, con el objetivo de verificar que los fragmentos obtenidos tuvieran el tamaño adecuado. El pico resultante corresponde a la temperatura de fusión del fragmento, y su altura es proporcional a la concentración.

Para las muestras de tejido y la curva de calibración de linfocitos, la amplificación se realizó con los *primers* TNF-F (5'-TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA-3') y TNF-R (5'-CAGCAAGCATCTATGCACTTAGACCCC-3') (13), empleando las mismas condiciones descriptas más arriba.

En cada placa se incluyeron controles positivos, negativos, y las curvas de calibración correspondientes (de *T. cruzi* y *A. thaliana* para las muestras de sangre, y *T. cruzi* y *TNF-α* para las muestras de tejido). Se emplearon dos controles negativos, el primero contenía ADN de un ratón sano, sin infección, y el segundo agua en lugar de ADN (blanco). Las muestras se corrieron por duplicado en cada ensayo, y cada ensayo se repitió dos veces, arrojando un total de cuatro réplicas por cada muestra. Las muestras se analizaron en paralelo a sus correspondientes curvas de calibración en cada ensayo.

El análisis de Ct y la curva de disociación se realizaron con el programa GeneAmp 5700 Sequence Detection Version 1.3 – Applied Biosystems, 1999. Las curvas de calibración se generaron con el programa GraphPad Prism Version 5.0, 2009. El análisis estadístico se realizó con el programa Infostat 2008 (Grupo Infostat FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## Resultados

En la curva de calibración para muestras de sangre, el primer punto correspondiente a la muestra de sangre sin diluir ( $10^6$  parásitos/mL) mostró una inhibición parcial de la PCR ( $Ct=13$ ), que desapareció en la siguiente dilución (1:10;  $10^5$  parásitos/mL). Esta inhibición fue generada probablemente por un exceso de ADN en la muestra, que contenía no sólo ADN del parásito sino también del ratón.

La curva de calibración para el ADN de *T. cruzi* con los primers Sat se realizó con los Ct de todos los puntos no inhibidos (Figura 1A), según la ecuación:

$$Ct = -3,4 \text{ Log } C + 30,76 \quad [1]$$

donde  $C$  (parásitos/mL) es la concentración de parásitos.

La eficiencia de amplificación de la qPCR ( $E_{qPCR}$ ), calculada según la ecuación [2], fue de 0,968 para las muestras de sangre, y 0,945 para las muestras de músculo esquelético. No se calculó  $E_{qPCR}$  para *A. thaliana* ( $r^2 = 0,9719$ ), porque se utilizó sólo como control interno para corroborar la presencia de ADN en las muestras de sangre y en las diluciones de la curva de calibración de *T. cruzi*.

$$E_{qPCR} = (10^{-1/\text{pendiente}}) - 1 \quad [2]$$

El sistema de cuantificación de *T. cruzi* por qPCR mostró un amplio rango dinámico (8 órdenes de magnitud:  $10^{-2}$  a  $10^6$  parásitos/mL), mientras que la PCR convencional tuvo un límite de detección un orden de magnitud menor (de  $10^{-1}$  parásitos/mL) para el mismo conjunto de diluciones.

En el caso de las muestras de músculo esquelético, el rango de detección de la curva de calibración de lin-

focitos por qPCR fue de 10 a  $10^5$  células/mL. El límite inferior de la curva de calibración fue menor que el de *T. cruzi* debido a que *TNF-α* es un gen de copia única y por el volumen de muestra empleado, se detectó un mínimo de 10 células/mL (Figura 1B). La concentración de parásitos fue calculada directamente de la curva estándar empleando la ecuación [1], para luego estimar el número de parásitos por célula (22).

Los resultados obtenidos analizando las muestras de sangre por ambas técnicas se resumen en la Tabla I, y los resultados obtenidos en las muestras de músculo esquelético en la Tabla II.

Tabla I. Detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre por PCR convencional y qPCR.

	PCR convencional			
	Positivos	Negativos	Totales	
qPCR	Positivos	2	5	7
	Negativos	0	18	18
	Totales	2	23	25

Aunque la carga parasitaria fue baja, 5 muestras positivas por qPCR resultaron negativas por PCR convencional. Estas muestras correspondían a sangre de ratones tratados con BZL (0,06 y 0,02 parásitos/mL) y tres tratados con NFOH (0,03; 0,028 y 0,015 parásitos/mL). En contraste, la PCR convencional solo detectó dos muestras positivas, correspondientes a ratones sin tratamiento (controles positivos; 0,35 y 0,1 parásitos/mL). Con estos resultados fue posible calcular el valor diagnóstico de la qPCR con respecto a PCR convencional, que en las muestras de sangre tuvo una sensibilidad de 100%; su especificidad fue del 78%, su valor predictivo positivo (VPP) fue 30% y el negativo (VPN) fue 100%,

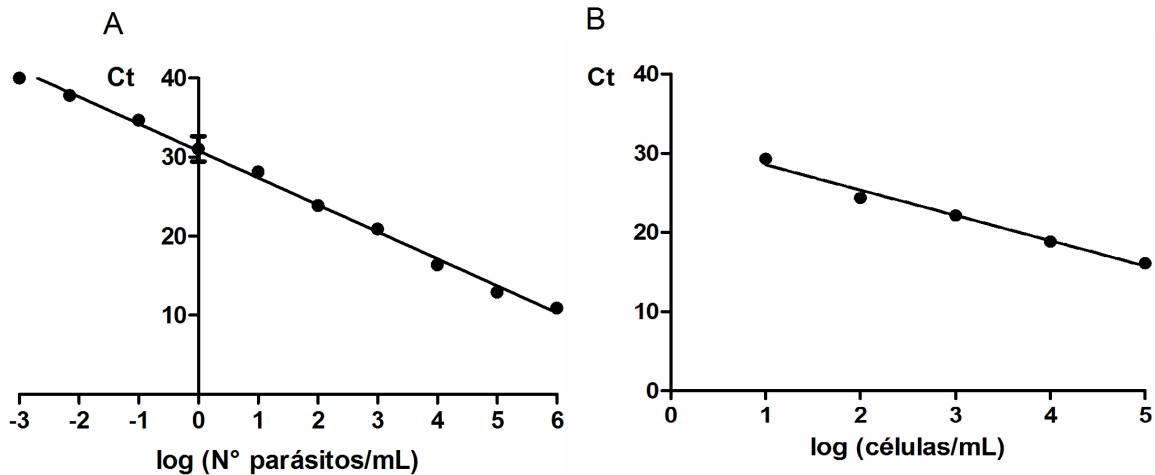


Figura 1. Curvas de calibración de *T. cruzi* en sangre (A) y *TNF-α* en linfocitos (B). A. Amplificación por qPCR del fragmento Sat en diluciones sucesivas de ADN de una muestra de sangre infectada artificialmente con *T. cruzi* ( $r^2=0,996$ ). B. Amplificación por qPCR de un fragmento de *TNF-α* en diluciones sucesivas de ADN de linfocitos murinos ( $r^2=0,9804$ ).

mientras que la razón de verosimilitud positiva (RVP) fue 4,6 y la negativa (RVN) de 0.

El CI (fragmento de *A. thaliana*) fue amplificado para cada dilución de ADN de *T. cruzi* proveniente de sangre, mostrando un elevado número de copias en todas las determinaciones (rango  $3 \times 10^7$  copias/pocillo). Este resultado fue importante para determinar que el proceso de extracción de ADN fue adecuado y para excluir inhibición de la reacción de amplificación (24). Por lo tanto, todas las muestras negativas fueron realmente negativas debido a la ausencia del fragmento Sat. Los falsos negativos, debidos a la pérdida de ADN durante la extracción o por inhibición de la polimerasa fueron controlados por la reacción positiva del CI (datos no mostrados).

Tabla II. Detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de músculo esquelético por PCR convencional y qPCR.

	PCR convencional			
		Positivos	Negativos	Totales
qPCR	Positivos	3	12	15
	Negativos	0	5	5
	Totales	3	17	20

En cuanto a la detección de ADN de *T. cruzi* en músculo esquelético, por qPCR se determinaron 15 muestras con 1 o más parásitos cada 100.000 células (rango 1-8 parásitos/ $10^5$  células), pero de éstas sólo 3 resultaron positivas por PCR convencional. Aunque las 3 muestras positivas fueron cuantificadas con 8; 5 y 2 parásitos/ $10^5$  células, no pudo establecerse un rango de detección para PCR convencional, ya que muchas muestras con similar número de parásitos cuantificados por qPCR no fueron detectadas por PCR convencional. Sólo 5 muestras resultaron negativas por qPCR, y de éstas, 2 pudieron cuantificarse con 0,1 parásitos/ $10^5$  células. De esta manera, la comparación de la técnica de qPCR con respecto a PCR convencional mostró los siguientes valores: 100% de sensibilidad; 29% de especificidad; 20% VPP; 100% VPN; 1,4 RVP y 0 RVN.

En el total de 45 muestras evaluadas, se detectó ADN de *T. cruzi* por qPCR en el 48,9% (22/45), mientras que por PCR convencional solo se detectó ADN del parásito en el 11,1% (5/45) de los casos. Considerando estos resultados, la fuerza de concordancia de *Kappa* (*k*) entre ambas técnicas fue débil (37%), mostrando diferencias significativas entre el rendimiento de la qPCR en comparación con la PCR convencional (prueba de McNemar corregida por efecto de estrato =16,34;  $p=0,0001$ )

## Discusión y Conclusiones

La detección de *T. cruzi* es difícil durante la fase crónica de la infección porque hay una baja carga de parási-

tos circulantes en el torrente sanguíneo, ya que éstos se encuentran alojados principalmente en células de músculo esquelético y cardíaco. Un hospedador mamífero infectado con *T. cruzi* normalmente tiene niveles de anticuerpos elevados durante la fase crónica, aún luego de recibir tratamiento tripanomicida. En el presente trabajo, el límite de detección de  $10^{-2}$  parásitos/mL para la qPCR fue similar a los obtenidos por diferentes autores empleando la misma química de detección. Caldas *et al* (17) encontraron  $10^{-1}$  parásitos/mL en sangre de ratones con infección crónica empleando *TNF- $\alpha$*  murino como control interno, y Duffy *et al.* (21) obtuvieron un límite de  $10^{-3}$  parásitos/mL en sangre de pacientes humanos empleando *A. thaliana* como control interno. De igual manera, empleando sondas TaqMan, Piron *et al* (25) detectaron hasta  $10^{-1}$  parásitos/mL en pacientes chagásicos, y Cummings y Tarleton (13) detectaron  $10^{-2}$  parásitos/mL en muestras de sangre murina.

En el presente trabajo, los resultados mostraron que qPCR y PCR convencional fueron igualmente eficaces para detectar parásitos circulantes en sangre en el rango medio-alto de la curva de calibración. Sin embargo, qPCR detectó una menor carga parasitaria en sangre, y su límite de detección fue sólo un orden de magnitud menor que la PCR convencional. Para la detección de ADN de *T. cruzi* en músculo esquelético, la técnica de qPCR fue más efectiva, ya que se determinaron 15 muestras positivas *vs.* 3 detectadas por PCR convencional.

La fuerza de concordancia de *Kappa* ( $k=0,37$ ) fue débil entre ambas técnicas, lo cual fue corroborado por la prueba de McNemar (corregida por efecto de estrato), la cual indica que los resultados de presencia/ausencia de *T. cruzi* en las muestras analizadas dependen significativamente de la técnica de PCR utilizada ( $p=0,0001$ ). La sensibilidad de la qPCR indica que esta técnica identifica el 100% de las muestras con ADN de *T. cruzi*, tanto en sangre como en músculo esquelético. En cambio, la especificidad de la qPCR presentó variaciones según el tipo de muestra analizado, ya que en muestras de músculo esquelético fue del 29%, indicando que un 61% de las muestras con ADN de *T. cruzi* no serían detectadas con la PCR convencional. Al analizar sangre, la especificidad de la qPCR fue de 78%, por lo cual en el 22% de estas muestras el ADN de *T. cruzi* no fue detectado con la PCR convencional. El valor predictivo positivo de la qPCR para muestras de músculo esquelético fue de 20%, mientras que para muestras de sangre fue de 30%. El valor predictivo negativo de la qPCR para músculo esquelético y sangre fue de 100% demostrando que, efectivamente, todas las muestras negativas no contenían ADN de *T. cruzi*. Además, de acuerdo con los valores de la razón de verosimilitud positiva se puede observar que la qPCR tiene 1,4 veces más probabilidad de detectar ADN de *T. cruzi* en músculo esquelético que la PCR convencional, mientras que en sangre esa pro-

babilidad es 3,4 veces mayor. Por otro lado, la razón de verosimilitud negativa fue 0 para músculo esquelético y sangre, indicando que no hay ninguna posibilidad de detectar ADN del parásito por PCR convencional en estas muestras cuando la qPCR da un resultado negativo.

Estos resultados apoyan parcialmente la discusión de Bastien *et al* (18) que califican a la PCR como un método con varias técnicas, y postula que la qPCR no es necesariamente más sensible que la PCR convencional debido a las distintas variables que influyen en los resultados. En este trabajo, la extracción de ADN y la manipulación técnica fueron idénticas para ambas determinaciones, pero los volúmenes de reacción, reactivos, regiones diana y termocicladores fueron diferentes para cada tipo de PCR, siendo la qPCR más sensible que la PCR convencional para ambos tipos de muestra, en particular en las de músculo esquelético.

En términos del modelo murino experimental, la mayor sensibilidad de la qPCR fue útil para determinar que la ausencia total de parásitos (cura estéril) luego del tratamiento es difícil de lograr. Sin embargo, en términos de progresión de la enfermedad, una baja carga parasitaria por qPCR indicaría un buen pronóstico para el hospedador, equivalente a un resultado negativo por PCR convencional. Los pocos parásitos circulantes en sangre remanentes luego del tratamiento representarían un menor riesgo de reinfección tisular, y sólo serían peligrosos en caso de una inmunosupresión que reactivara la infección, lo que también es válido para tejidos con baja carga parasitaria, en el orden de 3 parásitos cada 100.000 células. En estas condiciones, sería útil establecer un límite para la cantidad de parásitos circulantes en sangre que representa un riesgo significativo para la progresión de la enfermedad, ya que en la mayoría de los casos no existe una cura estéril.

#### AGRADECIMIENTOS

Subsidios: Fundación Florencio Fiorini, Proyectos Federales para Innovación Productiva (PFIP Salta 004) y CIUNSa (Proyecto N° 2008).

#### CORRESPONDENCIA

CAROLINA DAVIES

Instituto de Patología Experimental –CONICET –

Universidad Nacional de Salta

Avda. Bolivia 5150

4400 SALTA, Argentina

Tel/fax: +54-387-425-5333

E-mail: carolina.davies@exa.unsa.edu.ar

## Referencias bibliográficas

1. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, *et al*. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27: 95–125.
2. Rutledge RG, Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nuc Ac Res* 2003; 31 (16): e93.
3. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60.
4. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nuc Ac Res* 2004; 32 (12): e103.
5. Elias MCQB, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 129 (1): 1–9.
6. Rogers WO, Wirth DF. Kinetoplast DNA minicircles: Regions of extensive sequence divergence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 565-9.
7. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (7): 1477-82.
8. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia 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(1): e931.
9. Cancado JR. Criteria of Chagas' disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 (1): 331-5.
10. Rassi A, Luquetti AO. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas' disease). En: Kevin M. Taylor and Michael Miles, editors. *American Trypanosomiasis*. Boston: Kluwer Academic Publishers, USA, 2003.
11. Schijman A, Altchek J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin M, *et al*. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52 (3): 441-9.
12. Mora MC, Sánchez Negrette O, Marco JD, Barrio AB, Ciaccio M, Segura MA, *et al*. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, haemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J Parasitol* 2005; 91 (6):1468-73.
13. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 129: 53-9.
14. Zago MP, Barrio AB, Cardozo RM, Duffy T, Schijman AG, Basombrío MA. Impairment of infectivity and immunoprotective effect of a LYT1 null mutant of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immunol* 2008; 76: 443-51.
15. Virreira M, Martínez S, Alonso-Vega C, Torrico F, Solano M, Torrico MC. Short report: Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75 (6): 1082–4.
16. Giddings OK, Eickhoff CS, Smith TJ, Bryant LA, Hoft DF. Anatomical route of infection and protective mucosal immunity in *Trypanosoma cruzi* conjunctival infection. *Infect Immun* 2006; 74 (10): 5549-60.
17. Caldas S, Santana Caldas I, de Figueiredo Diniz L, de Lima WG, de Paula Oliveira R, Batista CA, *et al*. Re-

- al-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop* 2012; 123 (3): 170-7.
18. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative real-time PCR is not more sensitive than "conventional" PCR. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (6): 1897.
  19. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 (7): 1051-4.
  20. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy of Sciences. Washington D.C: The National Academy Press; 2008.
  21. Duffy T, Bisio M, Altchek J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favalaro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas' disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3 (4): e419.
  22. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (11): 5249-55.
  23. González A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizarid PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 3356-60.
  24. Nolan T, Hands RH, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal Biochem* 2006; 351: 308-10.
  25. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 2007; 103 (3): 195-200.

**Recibido: 7 de marzo de 2014**

**Aceptado: 10 de octubre de 2014**