



Biomédica

ISSN: 0120-4157

biomedica@ins.gov.co

Instituto Nacional de Salud

Colombia

Pavia, Paula Ximena; Montilla, Marleny; Flórez, Carolina; Herrera, Giomar; Ospina, Juan Manuel;

Manrique, Fred; Nicholls, Rubén Santiago; Puerta, Concepción

Reporte del primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria analizado por AP-PCR en

Moniquirá, Boyacá

Biomédica, vol. 29, núm. 4, diciembre, 2009, pp. 513-522

Instituto Nacional de Salud

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84312220004>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

PRESENTACIÓN DE CASO

Reporte del primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria analizado por AP-PCR en Moniquirá, Boyacá

Paula Ximena Pavia¹, Marleny Montilla², Carolina Flórez², Giomar Herrera³, Juan Manuel Ospina³, Fred Manrique³, Rubén Santiago Nicholls², Concepción Puerta¹

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

² Grupo de Parasitología, Subdirección de Investigación, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia

³ Grupo de Salud Pública, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Tunja, Colombia

Introducción. La principal vía de transmisión de la enfermedad de Chagas es por medio de los insectos vectores de la familia *Reduviidae*. Sin embargo, el parásito también puede ser transmitido de madres infectadas al feto *in utero*. Hasta la fecha no existen informes de casos de Chagas transplacentario en Colombia.

Objetivo. Presentar un caso de transmisión transplacentaria ocurrido en Moniquirá, Boyacá, Colombia, y confirmarlo con el análisis de las cepas aisladas de la madre y de su bebé mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores arbitrarios.

Materiales y métodos. De los hemocultivos positivos de una madre chagásica y su hijo, se extrajo el ADN de los tripanosomas y se caracterizó la especie y grupo por PCR. El genotipo de las cepas se determinó mediante AP-PCR con los iniciadores basados en los genes de β -globina (5'-CCTCACCTTCTTCATGGAG-3') y del ARNr 16S (5'-ACGGGCAGTGTACAAGACC-3'), en reacciones diferentes.

Resultados. Las cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de los hemocultivos de la madre y de su hijo mostraron el mismo perfil de amplificación por ambas pruebas de AP-PCR, concordante con el observado en las cepas *T. cruzi* I utilizadas como control. En los hemocultivos procedentes del recién nacido se encontró también *T. cruzi* II.

Conclusiones. Éste es el primer caso de enfermedad de Chagas transplacentaria reportado en el municipio de Moniquirá, que demuestra que esta forma de transmisión ocurre en el país. La presencia de infección mixta por ambos grupos de *T. cruzi* en las muestras del recién nacido, sugiere infección mixta en la madre, con mayor prevalencia de *T. cruzi* I, al menos en el hemocultivo.

Palabras clave: enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, intercambio materno-fetal, reacción en cadena de la polimerasa, Colombia.

The first case of congenital Chagas' disease analyzed by AP-PCR in Colombia

Introduction. The main route of Chagas disease transmission is through vectors of the insect family Reduviidae. However, the parasite can also be transmitted from infected mothers to their fetus *in utero*. Until now, no cases of congenital Chagas disease have been reported in Colombia.

Objective. A congenital Chagas disease case occurred in Moniquirá County, Boyacá, Colombia. It was confirmed by comparing strains isolated from the mother and her baby using polymerase chain reaction (PCR) with arbitrary primers.

Materials and methods. The parasite DNA was extracted from positive blood cultures of the afflicted mother and her son. The species confirmation and group detection were performed by PCR. The strain genotypes were determined by AP-PCR with two oligonucleotides based on the genes for the β -globin (5'-CCTCACCTTCTTCATGGAG-3') and 16S RrNA (5'-ACGGGCAGTGTACAAGACC-3'), in different reactions.

Results. The *T. cruzi* strains isolated from the blood cultures of the mother and her son showed the same amplification profile by the two AP-PCR tests; this corresponded with profiles of the *T.*

cruzi I strains used as controls. However, *T. cruzi* II was also found in the blood culture from the newborn.

Conclusions. This is the first case of Chagas disease transmission reported in Moniquirá, demonstrating that this form of transmission occurs in Colombia. The presence of both groups of *T. cruzi* in the newborn sample suggests mixed infection in the mother as well, with a higher prevalence of *T. cruzi* I, at least in the mother's blood culture.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, maternal-fetal exchange, polymerase chain reaction, Colombia, AP-PCR.

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por el flagelado *Trypanosoma cruzi*, que afecta principalmente a la población de Centroamérica y Suramérica. En 1990, se calculaba en 16 a 18 millones el número de personas infectadas en la región pero, gracias al éxito de la Iniciativa del Cono Sur en el control de la transmisión vectorial domiciliaria por *Triatoma infestans*, ese número se ha reducido a 9,8 millones, aproximadamente (1,2).

La principal vía de transmisión de *T. cruzi* es por medio de los insectos de la familia *Reduviidae*; sin embargo, el parásito también puede transmitirse de madres infectadas a sus hijos *in utero* (1,3). La infección intrauterina puede ocurrir tanto en la etapa aguda como en la crónica de la infección materna y afectar embarazos sucesivos y gemelares. Los recién nacidos infectados pueden presentar un amplio espectro de manifestaciones, que van desde apariencia sana y peso adecuado para la edad de gestación (90%) hasta cuadros graves que pueden conducir a la muerte, especialmente de los prematuros, siendo la hepatosplenomegalia la forma más común de presentación (Lorca M. Enfermedad de Chagas en América Latina. Experiencias de intervención en Chile. En: Guhl F, editor. Primer Taller Internacional sobre Control de la Enfermedad de Chagas; curso de diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad de Chagas; VI Reunión de la Iniciativa Andina para

el Control de la Enfermedad de Chagas. Bogotá D.C.: Corcas editores; 2005. p. 237-40).

El diagnóstico rápido y oportuno de los recién nacidos infectados es necesario por cuanto, entre más temprano se inicie el tratamiento antiparasitario específico, mayor es su probabilidad de curación (4,5).

La incidencia de la transmisión transplacentaria de la enfermedad de Chagas en países del Cono Sur oscila entre 1% y 10% en diferentes zonas geográficas (1,6). En Colombia no existe información de la magnitud de la transmisión transplacentaria, a pesar de que se estima que 700.000 personas provenientes de áreas endémicas se encuentran infectadas y 23% de la población general se encuentra en riesgo de adquirir la enfermedad (7).

Dada la importancia de conocer la incidencia de la enfermedad de Chagas transplacentaria en Colombia, se han iniciado estudios en los municipios endémicos de Miraflóres y Moniquirá (Boyacá). En este trabajo se presenta el primer caso de transmisión transplacentaria en el municipio de Moniquirá, analizando las cepas aisladas de hemocultivos positivos de la madre y su hijo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con cebadores arbitrarios (*arbitrarily primed polymerase chain reaction*, AP-PCR).

Materiales y métodos

El estudio "Enfermedad de Chagas transplacentaria en los municipios de Miraflóres y Moniquirá, Boyacá", que permitió encontrar este caso, tuvo tres fases. En la primera de ellas se realizó, como prueba de tamización, serología mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) en muestra de sangre tomada en papel de filtro a mujeres embarazadas de los

Correspondencia:

Concepción Puerta, Laboratorio de Parasitología Molecular, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-82, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfono: (+571) 320 8320, extensión 4024; fax: (571) 320 8320, extensión 4021.
cypuerta@javeriana.edu.co

Recibido: 22/10/08; aceptado: 16/06/09

municipios de Miraflores y Moniquirá en el segundo o último trimestre del embarazo, según la metodología del Instituto Nacional de Salud (8). En la segunda fase se hizo la confirmación serológica del diagnóstico en las madres mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA en muestras de suero (8) y toma de muestras para diagnóstico parasitológico, por microhematocrito, hemocultivo y PCR (8-12) a las madres seropositivas y a sus hijos; y en la tercera fase se realizó el tratamiento de los niños infectados. En los casos en que se encontraron hemocultivos positivos, se realizó PCR para identificación taxonómica de los aislamientos de *T. cruzi* (13).

Hemocultivo

Los hemocultivos se hicieron con muestras de sangre anticoagulada con citrato de sodio de la madre, a los nueve meses de gestación, y de su hijo, a los dos y cuatro meses del nacimiento. Se sembraron, aproximadamente, 1,5 ml de cada muestra en tres tubos con medio Tobie para la madre y dos tubos para el bebé (11). Los hemocultivos se observaron en microscopio invertido cada ocho días después del día de siembra.

Determinación de especie y grupo de las cepas

A partir de las muestras de sangre y de las cepas aisladas de los hemocultivos positivos de la madre y el hijo, se obtuvo el ADN con los métodos que utilizan clorhidrato de guanidina, en el caso de las muestras de sangre, o NP40 al 10%, para las cepas aisladas en cultivo, seguido de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. La cuantificación y el análisis de la calidad del ADN se hicieron por espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa.

El ADN obtenido de cada cepa fue amplificado con la PCR Tch2AF-R (9,10) para confirmar la presencia de *T. cruzi*. Para identificar el grupo correspondiente a cada cepa, se realizó la PCR basada en el gen miniexón que utiliza los iniciadores TC/TCI/TCII (13). Como controles del grupo I de *T. cruzi*, se utilizaron las cepas IRHO/CO/98/Munantá y MHOM/CO/07/H/

SEV, procedentes de Guateque y Moniquirá, Boyacá, y MHOM/CO/86/MR de Chiriguaná, Cesar; como controles del grupo II de *T. cruzi*, se utilizaron la cepa colombiana *P. geniculatus*/CO/98 (subgrupo IIb) procedente de Amalfi, Antioquia, las cepas de Brasil CAN III (subgrupo IIa), IRHO/BR/84/Y (subgrupo IIb) y CL Brener (subgrupo IIe), y la cepa venezolana Maracay (subgrupo IIe) (14). La intensidad de los fragmentos amplificados se determinó mediante densitometría en el fotodocumentador de geles Gel Doc™ EQ, utilizando el programa *Quantity One*, versión 4.5 (BIO-RAD).

AP-PCR

Para analizar los genotipos de las cepas aisladas en el hemocultivo, se amplificó cada muestra por AP-PCR con un cebador de 20 bases, correspondiente a una región del gen de la β -globina (15) y otra reacción con el cebador inverso de 21 bases del gen que codifica para el ARNr 16S (16). Las condiciones de reacción y el programa de amplificación se hicieron de acuerdo con lo descrito por Welsh y McCheland en 1990 (17), con algunas condiciones optimizadas en el laboratorio.

Los productos obtenidos se analizaron en geles de agarosa al 1,6% teñidos con bromuro de etidio y analizados con el programa *Quantity One*, versión 4.5 (BIO-RAD), teniéndose en cuenta solamente la presencia o ausencia de los fragmentos reproducibles e inequívocos obtenidos con cada uno de ellos, al menos, en tres ensayos diferentes. Los perfiles obtenidos se usaron para construir dendrogramas, usando el análisis de agrupación jerárquica mediante la media aritmética no ponderada (UPMGA, por su sigla en inglés).

Resultados

Descripción del caso

Se trata de una mujer embarazada de 36 años de edad, con 27 semanas de gestación, proveniente del municipio de Moniquirá (Boyacá), vereda La Carolina, ubicada a 1.700 msnm con temperatura de 19°C. La prueba ELISA en muestra de sangre de la madre tomada en papel de filtro, fue positiva. Las pruebas de PCR en muestras

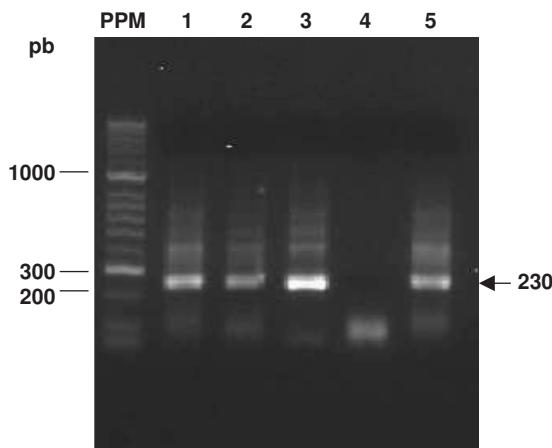


Figura 1. Amplificación del ADN de las cepas aisladas con la PCR TcH2A-R. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5 % coloreado con bromuro de etidio contenido en 10 μ l del producto de amplificación de las cepas aisladas de la madre (1), el hijo a los dos meses de nacimiento (2) y el hijo a los cuatro meses de nacimiento (3). En el control negativo (4), se usó agua destilada como plantilla. Como control positivo (5) se usó el ADN de la cepa IRHO/CO/98/Munantá. Se utilizó como patrón de peso molecular (PPM) el Hyper Ladder II (Bioline); los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.

de sangre, con los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36 (no se presentan los datos), fueron positivas para *T. cruzi*, mientras que la prueba de PCR para determinar los grupos del parásito, TC/TCI/TCII (no se presentan los datos), fue negativa.

El microhematocrito y las pruebas serológicas (ELISA) tomadas al bebé a los dos meses de edad, fueron negativos. Las pruebas de PCR en muestras de sangre del hijo con los iniciadores TcH2AF-R y S35-S36 (no se presentan los datos), fueron positivas para *T. cruzi*. En la prueba de PCR TC/TCI/TCII se amplificaron los fragmentos de 350 y 300 pb correspondientes a los grupos I y II del parásito, siendo la banda de 300 pb 1,5 veces más intensa que la de 350 pb (no se presentan los datos).

Para descartar la posible transmisión vectorial, se realizó búsqueda activa de triatomíos en el domicilio y peridomicilio de la paciente, y barrido de vegetación con red entomológica durante los meses de octubre, noviembre y diciembre del 2006, junio del 2007 y junio del 2008, la cual fue infructuosa en todas las oportunidades.

Es importante señalar que la vivienda de la paciente, con techo de asbesto, paredes en ladrillo con pañete y piso de tierra, se encuentra ubicada a 4 km del casco urbano, en una región que no reporta presencia de insectos triatomíos hace más de 14 años y que, además, ha sido fumigada en varias oportunidades en campañas realizadas por el Plan de Atención Básica y Plan de Atención Colectiva del Hospital Regional de Monquirá.

Cepas aisladas de la madre y su hijo

El hemocultivo de la madre fue positivo siete semanas después de la toma de la muestra. El hemocultivo realizado al hijo a los dos meses de edad, se tornó positivo un mes y 23 días después de la toma de muestras, y el realizado a los cuatro meses de edad se tornó positivo 3 meses y 14 días después.

En todos los aislamientos analizados mediante la prueba de PCR TcH2AF-R específica para *T. cruzi* (9,10), se obtuvo como producto de amplificación la banda esperada de 230 pb (figura 1). Los resultados de la prueba de PCR TC/TCI/TCII (13) demostraron que los parásitos aislados de la madre pertenecen al grupo *T. cruzi* I, con la banda de amplificación característica de 350 pb, mientras que en los aislados del hijo se evidenció una infección mixta, observándose las bandas de amplificación de 350 y 300 pb, correspondientes a los grupos *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, respectivamente (figura 2). Los análisis de densitometría de la intensidad de los fragmentos amplificados con los iniciadores TC/TCI/TCII mostraron que la banda de 350 pb fue 1,45 veces más intensa que la de 300 pb, a diferencia de los resultados de la misma prueba en sangre.

Análisis de los perfiles de AP-PCR

Se seleccionaron 35 fragmentos de amplificación con un tamaño molecular en el rango de 263 a 2.200 pb, obtenidos con ambos iniciadores con base en su resolución, intensidad y reproducibilidad en reacciones de amplificación separadas. Tal como se muestra en las figuras 3 a 6, ambos iniciadores generaron patrones polimorfos que permitieron correlacionar los perfiles con los grupos I y II del parásito.

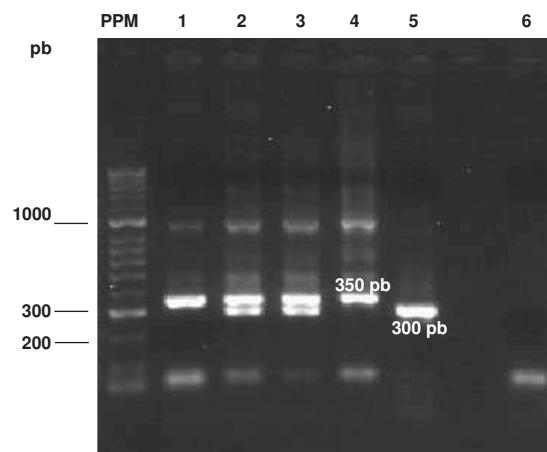


Figura 2. Amplificación del ADN de las cepas aisladas con los iniciadores TC, TCI, TCII. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,6 % coloreado con bromuro de etidio contenido 10 μ l del producto de amplificación de las cepas aisladas de la madre (1), el hijo a los dos meses de nacimiento (2) y el hijo a los cuatro meses de nacimiento (3). Como controles positivos se usó el ADN de la cepa del grupo *T. cruzi* I: IRHO/CO/98/Munantá (4) y del grupo *T. cruzi* II: IRHO/BR/84/Y (5). En el control negativo (6), se usó agua destilada como plantilla. Se utilizó como patrón de peso molecular (PPM) el Hyper Ladder II (Bioline); los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.

La amplificación del ADN de los parásitos aislados en el hemocultivo por AP-PCR con el cebador de la β -globina, mostró 14 fragmentos de amplificación entre 460 a 2.220 pb de tamaño molecular (figura 3). Se observó el mismo perfil de amplificación en la muestra procedente de la madre y de su hijo, el cual concordó con el patrón de amplificación observado en las cepas del grupo *T. cruzi* I utilizadas como control, para el 100% (4 de 4) de fragmentos compartidos con las cepas IRHO/CO/98/Munantá y MHOM/CO/07/H/SEV y 75% (3 de 4) con la cepa MHOM/CO/86/MR.

Por otra parte, al comparar los perfiles de amplificación de los aislamientos de la madre, su hijo, y el de las cepas IRHO/CO/98/Munantá *T. cruzi* I y MHOM/CO/07/H/SEV *T. cruzi* I, procedentes del departamento de Boyacá, con la cepa MHOM/CO/86/MR *T. cruzi* I del departamento de Cesar, se encontró que con este iniciador éstas comparten el 90% de los fragmentos amplificados.

Cuando se realizó la amplificación con el cebador ARNr 16S, se analizaron 21 fragmentos de 263 a 1.200 pb (figura 4). En las cepas aisladas por hemocultivo de la madre y de su hijo, se encontró un perfil idéntico de nueve bandas compartidas. Igualmente, al comparar los perfiles de amplificación de los aislamientos de la madre, y el de las cepas IRHO/CO/98/Munantá *T. cruzi* I y MHOM/CO/07/H/SEV *T. cruzi* I, procedentes del departamento de Boyacá, con la cepa MHOM/CO/86/MR *T. cruzi* I del departamento de Cesar, se encontró que con este iniciador éstas también comparten el 90% de los fragmentos amplificados.

Por otro lado, los análisis *in vitro* de los perfiles de AP-PCR utilizando ambos iniciadores en reacciones separadas para amplificar mezclas con cantidades diferentes de ADN procedentes de cepas de los grupos I y II del parásito, demostraron que cuando el ADN del grupo II se encuentra en menor proporción que el del grupo I, se desaparecen o disminuye la intensidad de los fragmentos específicos de este grupo (figuras 5A y 5B).

Análisis de variabilidad

En los dendrogramas construidos con base en los perfiles de AP-PCR generados por el cebador de la β -globina (figura 6A) y del ARNr (figura 6B), se observó claramente la división de los grupos I y II del parásito, con una distancia genética de 0,1 y 0,27, respectivamente.

Discusión

La identificación de los parásitos aislados de la madre y su hijo mostró la presencia de *T. cruzi* grupo I en ambos casos. Asimismo, los perfiles de amplificación obtenidos por AP-PCR de las cepas aisladas de la madre y su hijo fueron idénticos tanto con el cebador de la β -globina como con el del ARNr 16S y, en ambos casos, los perfiles de AP-PCR correspondieron a los del grupo *T. cruzi* I. También, es importante resaltar que los perfiles de AP-PCR observados en la madre y el hijo fueron más cercanos a los de las cepas IRHO/CO/98/Munantá y MHOM/CO/07/H/SEV, procedentes de Boyacá, que al de la cepa MHOM/CO/86/MR procedente del

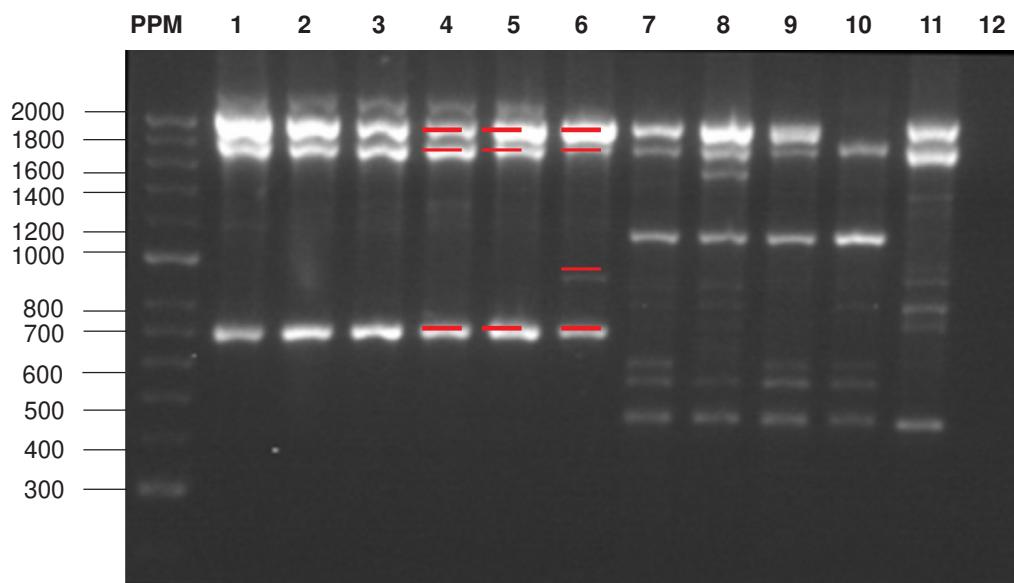


Figura 3. Amplificación por AP-PCR del ADN de las cepas aisladas con el cebador de la β -globina. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,6 % coloreado con bromuro de etidio contenido 10 μ l del producto de amplificación de las cepas aisladas de la madre (1), el hijo a los dos meses de nacimiento (2) y el hijo a los cuatro meses de nacimiento (3). Como controles positivos se usó el ADN de las cepas del grupo *T. cruzi* I: MHOM/CO/07/H/SEV (4), IRHO/CO/98/Munantá (5) y MHOM/CO/86/MR (6) y del grupo *T. cruzi* II: P.geniculatus/CO/98 (7), IRHO/BR/84/Y (8), CL Brener (9), CAN III (10) y Maracay (11). En el control negativo (12), se usó agua destilada como plantilla. Se utilizó como patrón de peso molecular (PPM) el Hyper Ladder II (Bioline); los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda. Los fragmentos para el análisis se seleccionaron con base en su intensidad y reproducibilidad en tres ensayos diferentes, como se indican con líneas en los controles de *T. cruzi* I.

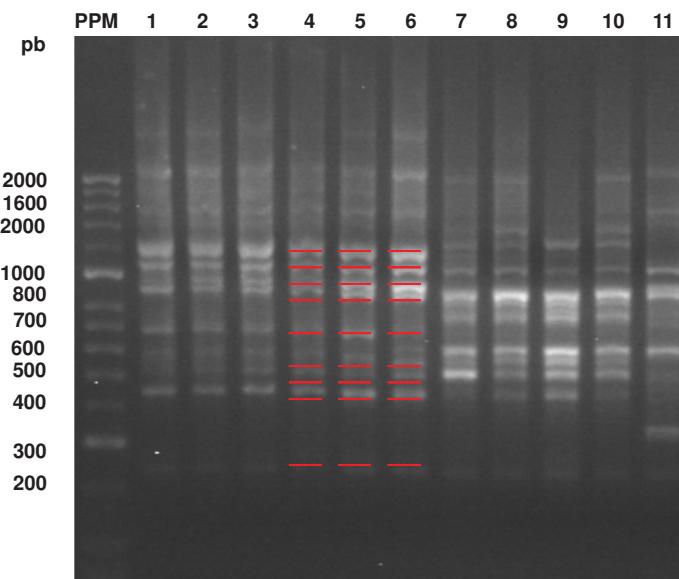


Figura 4. Amplificación por AP-PCR del ADN de las cepas aisladas con el cebador del gen del ARNr 16S. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,6 % coloreado con bromuro de etidio contenido 10 μ l del producto de amplificación de las cepas aisladas de la madre (1), el hijo a los dos meses de nacimiento (2) y el hijo a los cuatro meses de nacimiento (3). Como controles positivos se usó el ADN de las cepas del grupo *T. cruzi* I: MHOM/CO/07/H/SEV (4), IRHO/CO/98/Munantá (5) y MHOM/CO/86/MR (6) y del grupo *T. cruzi* II: P.geniculatus/CO/98 (7), IRHO/BR/84/Y (8), CL Brener (9), CAN III (10) y Maracay (11). Se utilizó como patrón de peso molecular (PPM) el Hyper Ladder II (Bioline); los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda. Los fragmentos para el análisis se seleccionaron con base en su intensidad y reproducibilidad en tres ensayos diferentes, como se indican con líneas en los controles de *T. cruzi* I.

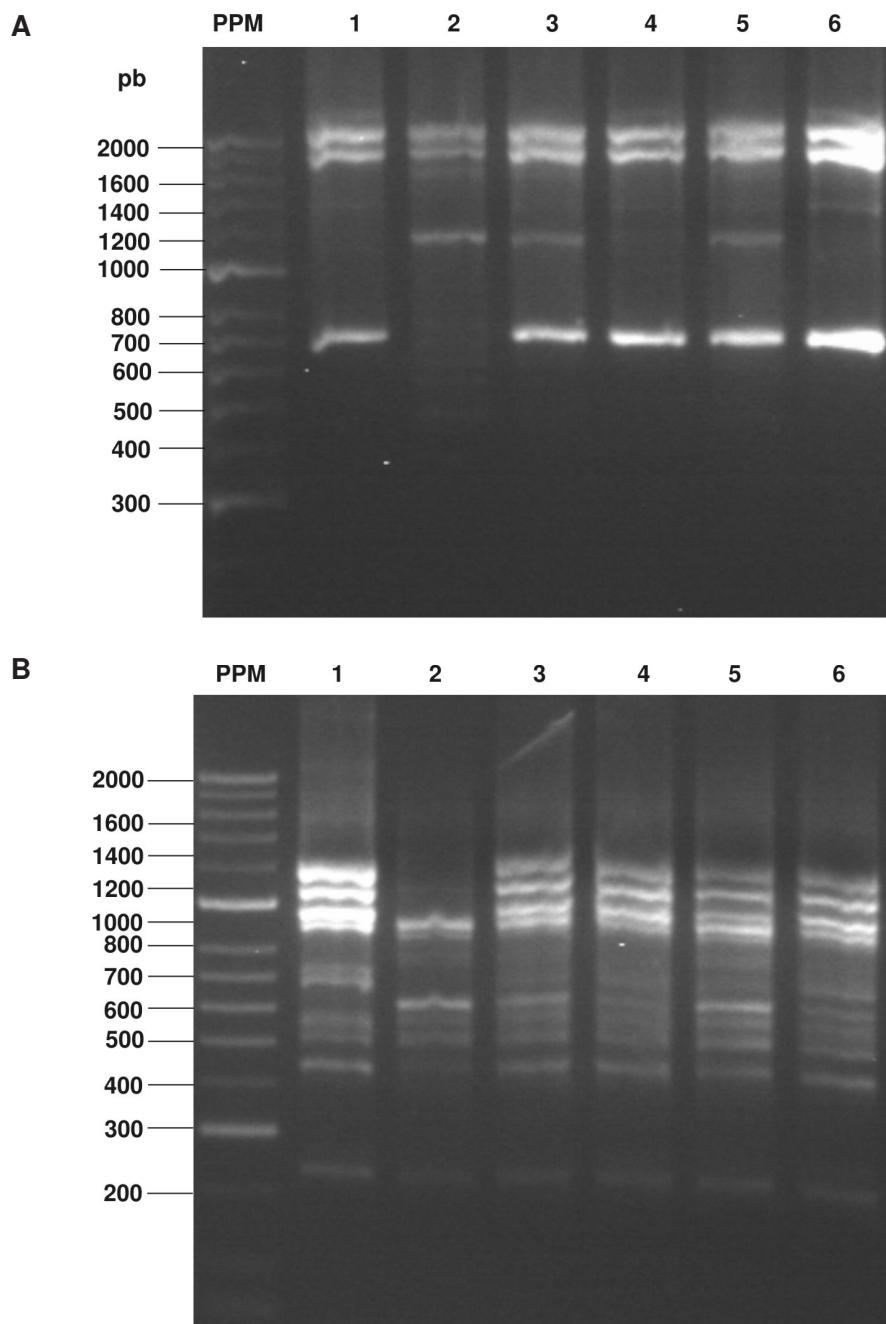


Figura 5. Amplificación por AP-PCR de mezclas ADN de las cepas IRHO/CO/98/Munantá e IRHO/BR/84/Y, pertenecientes a los grupos *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, respectivamente con el cebador de la β -globina (A) y del ADNr 16 S (B). Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,6 % coloreado con bromuro de etidio contenido 10 μ l del producto de amplificación de las cepas IRHO/CO/98/Munantá (1) e IRHO/BR/84/Y (2) y de una mezcla del ADN de estas cepas así: 10 ng *T. cruzi* I/ 20 ng *T. cruzi* II (3), 20 ng *T. cruzi* I/ 10 ng *T. cruzi* II (4), 5 ng *T. cruzi* I/ 10 ng *T. cruzi* II (5), 10 ng *T. cruzi* I/ 5 ng *T. cruzi* II (6). Se utilizó como patrón de peso molecular (PPM) el Hyper Ladder II (Bioline); los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda.

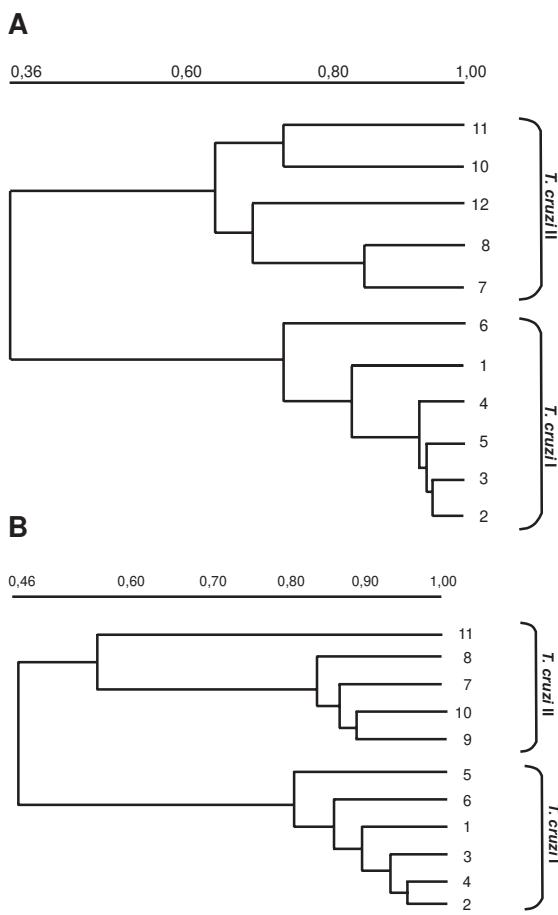


Figura 6. Dendogramas basados en los perfiles de AP-PCR de los iniciadores de (A) β -globina y (B) ADNr 16 S, cuyos datos fueron agrupados según el método jerárquico UPGMA. La escala en la parte superior indica la distancia genética calculada por el programa Quantity One versión 4.5 (BIO-RAD). Los números corresponden a los perfiles de la madre (1), el hijo a los dos meses de nacimiento (2) y el hijo a los cuatro meses de nacimiento (3), las cepas control del grupo *T. cruzi* I: MHOM/CO/07/H/SEV (4), IRHO/CO/98/Munantá (5) y MHOM/CO/86/MR (6) y del grupo *T. cruzi* II: P.geniculatus/CO/98 (7), IRHO/BR/84/Y (8), CL Brener (9), Maracay (10) y CAN III (11).

Cesar, lo cual sugiere que los genotipos de los parásitos circulantes en el área son iguales o, al menos, muy similares entre sí.

Mención especial merece el hallazgo de *T. cruzi* II en las muestras del bebé y no en las de la madre; esto indica la presencia de infección mixta en el recién nacido. Este hecho podría

explicarse por la presencia, igualmente, de infección mixta en la madre. Se sabe que la transmisión transplacentaria depende tanto de la cepa del parásito y de la carga parasitaria, como de la condición materna y de la competencia inmunológica placentaria (1,18). Es de esperar que, debido al estado de inmunosupresión general durante el embarazo, especialmente durante el primer trimestre, exista un mayor número de parásitos circulantes en la madre durante este período en comparación con la época posterior al parto.

Dado que la muestra para el hemocultivo de la madre fue tomada a los dos meses después del parto, pudo ocurrir que en ese momento los parásitos *T. cruzi* II circulantes fueran escasos o estuvieran ausentes. Es más, la prueba de PCR TC/TCI/TII de la madre en sangre fue negativa, lo cual demuestra que la carga parasitaria del momento se encontraba para ambos grupos por debajo del límite de detección de la prueba. También es posible que, durante el cultivo de la sangre materna, ocurriera un proceso de selección que conllevara al aislamiento de tan sólo los parásitos *T. cruzi* I.

Se ha visto que las infecciones naturales por *T. cruzi* pueden estar compuestas de poblaciones del parásito, tanto del grupo *T. cruzi* I como del grupo *T. cruzi* II. Sin embargo, con el tiempo puede ir generándose una selección y predominar una de las dos poblaciones (19,20). De hecho, en infecciones mixtas de ratones con clones de cepas colombianas de ambos grupos del parásito se demostró predominio del clon *T. cruzi* I tanto en la sangre como en los órganos (21).

En el caso del recién nacido, por ejemplo, mientras en la muestra de sangre se observó más intensidad en el fragmento de amplificación correspondiente al grupo II, en la muestra de la cepa aislada del hemocultivo, el fragmento correspondiente al grupo I fue el más intenso, lo cual sugiere que durante el hemocultivo hubo predominio de los parásitos del grupo I. Es importante anotar también que en el desarrollo de este trabajo se han aislado otras dos cepas *T. cruzi* II en los municipios de Mirafores y

Moniquirá (Boyacá), lo que confirma la circulación de *T. cruzi* II en este departamento.

Al analizar los perfiles de AP-PCR generados con ambos cebadores, como ya se mencionó anteriormente, éstos coinciden con los generados por los parásitos pertenecientes al grupo *T. cruzi* I y no con los generados por ambos grupos como era de esperarse dada la infección mixta presente en el recién nacido.

A este respecto, es importante señalar que los ensayos *in vitro* realizados utilizando mezclas de ADN de ambos grupos del parásito, explican los resultados obtenidos ya que, en presencia del doble de cantidad de ADN de parásitos del grupo *T. cruzi* I, los fragmentos de amplificación específicos del grupo *T. cruzi* II desaparecen o disminuyen de forma importante en la intensidad de su amplificación. El análisis de densitometría de la intensidad de los fragmentos amplificados con la PCR TC/TCI/TCII del ADN de las cepas aisladas en el hemocultivo, también apoya esta hipótesis, ya que la banda de 350 pb correspondiente al grupo *T. cruzi* I fue 1,45 veces más intensa que la de 300 pb correspondiente al grupo *T. cruzi* II.

En conclusión, estos resultados demuestran, por primera vez, la transmisión transplacentaria de *T. cruzi* en Colombia, por lo cual es de gran importancia continuar con estudios que proporcionen información sobre la incidencia y prevalencia de esta forma de transmisión en el país, ya que la enfermedad de Chagas transplacentaria no se limita a las áreas rurales en donde ocurre transmisión vectorial, sino que cada vez con mayor frecuencia se tienen reportes en ciudades donde han migrado desde el campo mujeres en edad fértil.

Por ejemplo, en Buenos Aires (Argentina), como resultado de la migración desde zonas endémicas, la infección se detecta en 2,6% a 6,7% de las mujeres embarazadas (22).

Aun cuando la transmisión vertical de *T. cruzi* no puede prevenirse, la vigilancia mediante el diagnóstico rápido y oportuno de los recién nacidos infectados es prioritaria por cuanto se sabe que cuanto más temprano se inicie el

tratamiento antiparasitario específico, mayor es la recuperación, llegando a presentarse tasas de curación hasta del 100% (23).

De acuerdo con la experiencia acumulada en los países del Cono Sur, un programa de vigilancia y control de la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas debe incluir:

- a) la tamización serológica en las gestantes durante el embarazo;
- b) la confirmación diagnóstica de las mujeres gestantes positivas en la tamización;
- c) el seguimiento y la evaluación clínica y de laboratorio, mediante pruebas para detectar el parásito, de los recién nacidos hijos de madres seropositivas, y
- d) el seguimiento serológico a la edad de nueve meses o más, de los hijos de madres infectadas en quienes no se detectó la infección por métodos parasitológicos en su etapa de recién nacidos (24).

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a las autoridades de Salud del municipio de Moniquirá, al personal del Hospital Elías Olarte y a Myriam Lorca, asesora internacional del proyecto "Enfermedad de Chagas transplacentaria en los municipios de Miraflóres y Moniquirá, Boyacá".

Conflictos de intereses

Los autores del presente artículo declaramos que no tenemos conflictos de intereses de orden académico, institucional u operacionales en esta investigación.

Financiación

El estudio fue desarrollado como parte del proyecto 1109-04-18231 financiado por Colciencias.

Referencias

1. World Health Organization. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series 905. Geneva: WHO; 2002. p. 82-3.
2. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006;22: 583-8.

3. **World Health Organization.** Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series 811. Geneva: WHO; 1991. p. 1-95.
4. **Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulián L, Flores I, et al.** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operacional outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health.* 2000;5:293-301.
5. **Luquetti AO, Dias JC, Prata, A.** Diagnosis and treatment of congenital infection caused by *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Parasitol Res.* 2006;99:379-83.
6. **Rosa R, Basnadjian Y, González MM, González M, Salvatella R.** Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Rev Med Uruguay.* 2001;17:125-32.
7. **Moncayo A.** Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98:577-91.
8. **Guhl F, Nicholls RS.** Manual de procedimientos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Bogotá, D.C.: Quebecor Impresores; 2001.
9. **Pavia P, Cuervo C, Montilla M, Nicholls S, Puerta C.** Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*. *Infectio.* 2003;7:129-36.
10. **Pavia P, Vallejo GA, Montilla M, Nicholls RS, Puerta CJ.** Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification histone H2A and sno-RNA-CL1 genes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007;49:23-30.
11. **Duque S, Peláez D, Corredor A.** Normas para cultivo *in vitro* de parásitos de la familia trypanosomatidae. Manual de procedimientos. Bogotá, D.C.: Instituto Nacional de Salud; 1993.
12. **Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L.** Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;33:205-14.
13. **Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, et al.** Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int J Parasitol.* 2005;35:225-33.
14. **Saldaña CH, Cordova OP, Vargas FV.** Utilización de *Lepidium peruvianum* (Maca), como medio de cultivo para el crecimiento de *T. cruzi*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 2006;23:137-40.
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;68:574-82.
16. **Hypsa V, Dale C.** *In vitro* culture and phylogenetic analysis of "Candidatus Arsenophorus triatominarum," an intracellular bacterium from the triatomine bug, *Triatoma infestans*. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:1140-4.
17. **Welsh J, McClelland M.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 1990;18:7213-8.
18. **Triquell MF, Díaz-Luján C, Freilij H, Paglini P, Fretes RE.** Placental infection by two subpopulations of *Trypanosoma cruzi* is conditioned by differential survival of the parasite in a deleterious placental medium and not by tissue reproduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Mar 30. [Epub ahead of print]
19. **Franco DJ, Vago AR, Chiari E, Meira FC, Galvao LM, Machado CR.** *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp Parasitol.* 2003;104:54-61.
20. **Liarte DB, Murta SM, Steindel M, Romanha AJ.** *Trypanosoma cruzi*: Multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Exp Parasitol.* 2008. doi: 10.1016/j.exppara.2008.12.005. [Epub ahead of print].
21. **Botero LA, Mejía AM, Triana O.** Caracterización biológica y genética de dos clones pertenecientes a los grupos I y II de *Trypanosoma cruzi* de Colombia. *Biomédica.* 2007;27(Suppl.1):1:64-74.
22. **Neto EC, Rubin R, Schulte J, Giugliani R.** Newborn screening for congenital infectious disease. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1068-73.
23. **Freilij H, Altcheh J.** Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis.* 1995;21:551-5.
24. **Carlier Y, Torrico F.** Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 2003;6:767-71.